



TESIS DOCTORAL

**DESARROLLO DE NUEVAS TÉCNICAS INMUNOLÓGICAS Y
MOLECULARES PARA LA DETECCIÓN DE CITOQUINAS EN
GANADO VACUNO Y SU APLICACIÓN AL ESTUDIO DE LA
RESPUESTA INMUNE EN LA HIPODERMOSIS BOVINA**

Eva Cabanelas Dopazo

DEPARTAMENTO DE PATOLOGÍA ANIMAL

FACULTADE DE VETERINARIA

LUGO 2017

LUGO
2017



AUTORIZACIÓN DE LOS DIRECTORES DE TESIS

D. Pablo Díez Baños

Catedrático del Área de Sanidad Animal de la Facultad de Veterinaria de Lugo.
Universidad de Santiago de Compostela,

Dña. Rosario Panadero Fontán

Profesora Titular del Área de Sanidad Animal de la Facultad de Veterinaria de Lugo,
Universidad de Santiago de Compostela,

D. Ceferino M. López Sáñez

Profesor Titular del Área de Sanidad Animal de la Facultad de Veterinaria de Lugo,
Universidad de Santiago de Compostela,

Como directores de la Tesis Doctoral titulada

“Desarrollo de nuevas técnicas inmunológicas y moleculares para la detección de citoquinas en ganado vacuno y su aplicación al estudio de la respuesta inmune en la hipodermosis bovina”.

Presentada por Dña. Eva Cabanelas Dopazo

Alumna del Programa de Doctorado D2071V01 Investigación en Medicina y Sanidad Veterinaria

Autorizan la presentación de la tesis indicada, considerando que reúne los requisitos exigidos en el artículo 34 del reglamento de Estudios de Doctorado, y que como Directores de la misma no incurre en las causas de abstención establecidas en la Ley 40/2015.

Y para que conste a los efectos oportunos, firman en Lugo, a 25 de enero de 2017.

Pablo Díez Baños

Rosario Panadero

Ceferino M. López



Los resultados obtenidos en el desarrollo de esta Tesis han dado lugar a las siguientes publicaciones:

Artículos de investigación

1. PANADERO R.; LOPEZ C.; VAZQUEZ L.; DIAZ P.; PEREZ A.; **CABANELAS E.**; MORRONDO P.; DIEZ-BAÑOS P. (2013). Effect of reinfestations on systemic immune responses in cattle naturally infested by *Hypoderma* sp. (Diptera: Oestridae). **Veterinary Parasitology**, 193: 238-244.
2. **CABANELAS, E.**; PANADERO, R.; FUERTES, M.; FERNÁNDEZ, M.; BENAVIDES, J.; LÓPEZ, C.; PÉREZ-CREO, A.; DÍAZ, P.; MORRONDO, P.; DÍEZ-BAÑOS, P.; PÉREZ, V. (2015). Histological and immunohistochemical characterization of *Hypoderma lineatum* (Diptera: Oestridae) warbles. **Veterinary Parasitology**, 212: 361-367.
3. **CABANELAS, E.**; LÓPEZ, C.; DÍAZ, P.; PÉREZ-CREO, A.; MORRONDO, P.; DÍEZ-BAÑOS, P.; PANADERO, R. (2016). Evaluation of IFN- γ production in bovine hypodermosis using ELISPOT and ELISA. **Veterinary Medicine and Animal Sciences**, 4 (2). (<http://dx.doi.org/10.7243/2054-3425>).
4. **CABANELAS, E.**; LÓPEZ, C.; DÍAZ, P.; PÉREZ-CREO, A.; MORRONDO, P.; DÍEZ-BAÑOS, P.; PANADERO, R. (2016). Modulatory effects of interferon- γ and interleukin 4 on cellular immune responses against *Hypoderma lineatum* antigens. **Medical and Veterinary Entomology**, 30: 439-443.

Artículos de divulgación

1. **CABANELAS, E.**; DÍAZ, P.; PÉREZ, A.; NAVARRO, E.; PRIETO, A.; DÍAZ-CAO, J.M.; LÓPEZ, C.; PANADERO, R.; FERNÁNDEZ, G.; MORRONDO, P.; DIEZ-BAÑOS, P. (2015). Parasitosis externas en ganado vacuno. **Albéitar**, 188: 14-16.
2. DIAZ, P.; PÉREZ /A.; **CABANELAS, E.**; PRIETO A.; DÍAZ, J.; SOILAN M.; LOPEZ C.; PANADERO, R.; FERNÁNDEZ, G.; MORRONDO P.; DIEZ-BAÑOS P. (2014). Parasitoses máis frecuentes no gando vacún de Galicia e a súa repercusión sobre as produccions. **Revista de la Asociación de Frisona Gallega (AFRIGA)**. 110: 78-84.

Comunicaciones a Congresos

1. DIEZ-BAÑOS P.; DÍAZ P.; LÓPEZ C.; **CABANELAS E.**; PÉREZ A.; MORRONDO P.; PANADERO R. (2012) Diseño de un programa sanitario frente a la hipodermosis bovina en Galicia. Participación: Oral. **XVII Congreso Internacional ANEMBE de Medicina Bovina**, Santander, 18-20 abril.
2. PANADERO R.; **CABANELAS E.**; MONTERO M.; LÓPEZ C.; DÍAZ P.; PÉREZ A.; MORRONDO P.; DIEZ-BAÑOS P. (2012). Emergence period of mature *Hypoderma lineatum* larvae in Northwestern Spain and its relation with early diagnosis and treatment. Participación: Poster. **XXVII Congresso Nazionale Società Italiana de Parasitologia (SOIPA)**. Publicación: **Mappe Parassitologiche**; **18**: 119, Alghero (Italia), 26-28 junio.
3. **CABANELAS E.**; DÍAZ P.; LÓPEZ C.; PÉREZ A.; MORRONDO P.; DIEZ-BAÑOS P.; PANADERO R. (2012). Assessment of an ELISPOT test to evaluate IFN-gamma responses in cattle infested by *Hypoderma* spp. Participación: Oral. **XXVII Congresso Nazionale Società Italiana de Parasitologia (SOIPA)** Publicación: **Mappe Parassitologiche**; **18**: 119, Alghero (Italia), 26-28 junio.
4. PANADERO R.; LÓPEZ C.; **CABANELAS E.**; DÍAZ P.; PÉREZ A.; MORRONDO P.; DIEZ-BAÑOS P. (2013). Valor diagnóstico de los niveles de antígenos y anticuerpos circulantes durante las fases iniciales de la hipodermosis bovina. Participación: Oral. **XVII Congreso Internacional ANEMBE de Medicina Bovina**, Lérida, 24-26 abril.
5. **CABANELAS E.**; MONTERO, M.; LÓPEZ, C.; DÍAZ P.; PÉREZ-CREO A.; LÓPEZ C.; MORRONDO P.; DIEZ-BAÑOS P.; PANADERO R. (2013). Evolution of morphological features in subcutaneous *Hypoderma* larvae and its usefulness as indicator of larval maturity. Participación: Poster. **XVIII Congreso de la Sociedad Española de Parasitología**, Gran Canaria, 17-20 septiembre.
6. **CABANELAS E.**; MONTERO, M.; VAZQUEZ, S.; LÓPEZ, C.; PÉREZ-CREO A.; DÍAZ P.; MORRONDO P.; DIEZ-BAÑOS P.; PANADERO R. (2013). Cellular responses involved in the destruction of subcutaneous larvae of *Hypoderma* (Diptera: Oestridae) Participación: Oral. **XVIII Congreso de la Sociedad Española de Parasitología**. Gran Canaria, 17-20 septiembre.
7. **CABANELAS, E.**; LÓPEZ, C.; PÉREZ-CREO, A.; DÍAZ, P.; MORRONDO, P.; DIEZ-BAÑOS, P.; PANADERO, R. (2014). Comparación de dos técnicas inmunoenzimáticas para la detección de IFN- γ en ganado vacuno infestado por *Hypoderma*. Participación: Oral. **II Encontro Mocidade Investigadora EDI-USC**; Santiago de Compostela, 29-31 de enero.

8. **CABANELAS, E.**; PÉREZ, V.; FUERTES, M.; BENAVIDES, J.; LÓPEZ-SÁNDEZ, C.; PÉREZ-CREO, A.; DIAZ, P.; MORRONDO, P.; DÍEZ-BAÑOS, P.; PANADERO, R. (2014). Histological characterization of *Hypoderma* warbles. Participación: Oral. **XXI International Congress of the Mediterranean Federation for Health and Production of Ruminants**, Cartagena, 23-26 de abril.
9. **CABANELAS, E.**; PANADERO, R.; FUERTES, M.; FERNÁNDEZ, M.; BENAVIDES, J.; LOPEZ, C.; PÉREZ-CREO, A.; DIAZ, P.; MORRONDO, P. DIEZ-BAÑOS, P.; PÉREZ, V. (2015). Histological characterization of *Hypoderma linetaum* (Diptera: Oestridae) warbles. Participación: Poster. **25th International Conference of the WAAVP**. Liverpool, Reino Unido 16-20 de agosto.
10. **CABANELAS, E.**; PANADERO, R.; LÓPEZ, C.; PÉREZ-CREO, A.; DÍAZ, P.; MORRONDO, P.; DÍEZ-BAÑOS, P.; ALVES, M.; BAUMANN, A. (2016). Puesta a punto de un protocolo de qRT-PCR para la determinación de citoquinas en cultivos celulares de ganado vacuno y su aplicación al estudio de la hipodermosis. Participación: Oral. **IV Encontro da Mocidade Investigadora da USC**. Santiago de Compostela, 9-10 de junio.





FINANCIACIÓN

Este trabajo se ha realizado en parte gracias a la concesión de las siguientes ayudas y proyectos de investigación:

Beca predoctoral del “Plan galego de Innovación, Investigación e Crecemento 2011-2015” (Plan I2C) concedida por la Xunta de Galicia (04/12/2012-03/12/2015) a Doña Eva Cabanelas Dopazo.

Beca de Postgrado para estancias en el extranjero (Convocatoria 2015) concedida por la Fundación Barrié de la Maza a Doña Eva Cabanelas Dopazo para realizar una estancia de 3 meses (15/01/2016-15/04/2016) en el “Institute of Virology and Immunology” de la Universidad de Berna (Suiza).

Hipodermosis bovina: respuesta inmunitaria celular y citoquinas como factores determinantes de protección (AGL-2004-01827). Ministerio de Educación y Ciencia. Dirección General de Investigación Científica y Técnica (2004-2007). Investigador principal: Pablo Díez Baños.

Patrones de producción de citoquinas y su efecto inmunomodulador en la hipodermosis bovina (AGL-2009-08939). Ministerio de Ciencia e Innovación. Secretaría de investigación (2009-2012). Investigador principal: Rosario Panadero Fontán.

Rede de Estudio Multidisciplinar dos ruminantes en Galicia (RUMIGAL). Programa de Consolidación e estruturación de unidades de investigación competitivas. Consellería de Educación, Cultura e Ordenación Universitaria (2014-2015). Investigador principal: Rosario Panadero Fontán.

Consolidación e Estruturación 2015. Grupos de Referencia Competitiva: GI-1702 Investigación en Sanidade animal: Galicia INVESAGA. Plan Galego. Consellería de Educación, Cultura e Ordenación Universitaria (2015-2018). Investigador principal: Pablo Díez Baños.





A mi abuelo



AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi más sincera gratitud a todas aquellas personas que de forma directa o indirecta han contribuido a la realización del presente trabajo y de manera especial:

A mis directores, por asesorarme pacientemente durante estos cinco años e instruirme en todos y cada uno de los aspectos de la carrera investigadora. Al Catedrático de la unidad de Parasitología y Enfermedades Parasitarias, el Prof. Dr. Pablo Díez Baños por su amparo dentro y fuera del departamento, su interés constante en el desarrollo de mi trabajo y sus conocimientos lingüísticos, que sin duda, han enriquecido mis textos. A la Profa. Dra. Rosario Panadero, por su paciencia, por la confianza depositada en mí y por sus infinitas enseñanzas; estoy segura que bajo la tutela de cualquier otra persona no habría llegado hasta el final. Al Prof. Dr. Ceferino Manuel López Sánchez por su generosidad, sus conocimientos en materia informática y estadística y por los apelativos con los que me ha bautizado.

Al Prof. Dr. Pablo Díaz por ser para mí, un auténtico “hermano mayor”, por sus esfuerzos continuos por comprender mi naturaleza y por proporcionarme en todo momento, los consejos y la inspiración necesarios para buscar mi camino.

A la Catedrática Profa. Dra. M^a Patrocinio Morrondo Pelayo por su trato cercano y amable; por sus lecciones de protocolo y su esfuerzo porque nos sintamos a gusto.

A la Profa. Dra. Rita Sánchez-Andrade, por su paciencia y sus sabios consejos desde el despacho de al lado; al Prof. Dr. Adolfo Paz Silva, por su sentido del humor y sus carcajadas, que tantas veces se me han contagiado y a la Profa. Dra. María Sol Arias, por esas sonrisas intercambiadas en el pasillo del departamento.

Al Prof. Dr. Gonzalo Fernández Rodríguez por compartir conmigo numerosas anécdotas de la profesión; por ilustrarme en el campo de las enfermedades infecciosas y como no, en materia de baile.

A los veterinarios, Diego Fariñas, por nuestras conversaciones trascendentales, por el intercambio literario y junto a “Ñampa”, por el suministro de muestras para este trabajo. A Miguel Viña, por llevarme de paseo al campo, por su simpatía y por esos abrazos tan reconfortantes.

A mis compañeros de laboratorio y amigos, a los que están y a los que se han ido. A los de la primera etapa, Javi Pato, Rosalía y Andreu; a menudo recuerdo nuestras conversaciones y sonrío. A los de la segunda, Esther y Pablete; por tener la fuerza de voluntad para compatibilizar la tesis con un trabajo, se merecen todo mi respeto. Ella puso la nota andaluza; él, trajo las cabras a mi vida. A la nueva generación, Susana, por sus caras de asombro y la ayuda técnica prestada. A Ana, que estuvo a mi lado a lo largo de estos cinco años, formando parte del “núcleo duro”; porque conocerla a ella y a Alberto, es una de las mejores cosas que me han pasado en la vida; sobran las palabras.

A los demás compañeros de Enfermedades Parasitarias: a Cristiana, a Isa, a Silvia, a Malagón y a Fabián, por los buenos ratos compartidos dentro y fuera del laboratorio. Una mención especial para Anish, mi gran amigo indio, una de las personas más nobles que he conocido; por sus palabras de aliento y las lágrimas al despedirnos.

A los compañeros de Enfermedades Infecciosas: a Alberto, por su buen hacer, su inmensa paciencia y su pulcritud laboral y personal. A Jose, por su ayuda en cuestiones técnicas, su particular sentido del humor y por enseñarme economía del lenguaje. A Gonzalo, por su simpatía, su compañerismo y por hacerme de chófer más de una vez.

A los compañeros del departamento de Patología Animal de la Facultad de León, por acogerme con los brazos abiertos y hacer de mis estancias con ellos, experiencias inolvidables. A Valentín, por ser un tutor excepcional; a Julio, por su ayuda al microscopio y por supuesto, a Miguel, mi instructor en materia de bares y laboratorio. A Maica, Gloria, Tere, Pablo y Marcos, por los viajes en coche y las largas conversaciones en el departamento. A Maikel, mi vecino asturiano, por abrirme las puertas de su casa y convertirse en uno de los mejores amigos que pudiera imaginarme.

A los compañeros del departamento de Inmunología de la Facultad de Berna, especialmente a “Carlito”, mi colega colombiano, a Marco Alves, por su disposición a tutorizarme y por supuesto, a Arnaud Bauman; por sus enseñanzas, sus bromas y su sonrisa en los días amargos. Sinceramente, no sé qué habría hecho en su ausencia.

A todos los amigos que he hecho en Lugo a lo largo de estos diez años, porque todos y cada uno de ellos forman parte de esto. A Adri, por su apoyo incondicional en los primeros años, por enseñarme a creer en mí y repetirme siempre, “tú harás algo grande”. A Cruz, por sus sabios consejos y su cariño de madre. A Ire, Miki, Vane, Lore

y Diego por regalarme miles de anécdotas en nuestros cinco años de carrera; gracias por hacer que el tiempo pasase tan rápido a vuestro lado. A Anabel, Marianela, Esti, Lucas y Laura por sus enseñanzas en la convivencia, su carácter excepcional y su amistad incondicional a través de los años.

A mi familia. A mi hermana Margui, por ser mi referente en la vida; mi Elsa de “Frozen”; ojalá algún día llegue a ser tan buena en mi trabajo como lo es ella en el suyo. A mis padres Perfecto y Margarita por su inmensa generosidad, por renunciar a sus sueños para cumplir los nuestros y por inspirarme para ser, como ellos, cada día mejor persona. A Álex, por su fe ciega en mí, por compartir mis sueños y recordarme a diario las pequeñas cosas que tan felices nos hacen.

A mi abuelo Pepe, porque sé que allá donde esté, estará sonriendo. Te quiero.





INDICE

1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS GENERALES	1
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	7
2.1. HIPODERMOSIS	9
2.1.1. AGENTE ETIOLÓGICO	9
2.1.1.1. Morfología	9
2.1.1.2. Ciclo biológico	14
2.1.1.3. Cronobiología.....	17
2.1.2. PATOGENIA	20
2.1.3. MANIFESTACIONES CLÍNICAS	21
2.1.4. LESIONES	23
2.1.4.1. Fase de invasión cutánea.....	23
2.1.4.2. Fase de migración y reposo	24
2.1.4.3. Fase subcutánea en el dorso.....	27
2.1.5. RESPUESTA INMUNE EN LA INFESTACIÓN POR <i>Hypoderma</i> spp.	28
2.1.5.1. Hipoderminas y su carácter inmunomodulador.....	28
2.1.5.2. Respuesta innata.....	37
2.1.5.3. Respuesta adquirida.....	38
2.1.5.3.1. Respuesta celular	38
2.1.5.3.2. Respuesta humoral.....	40
2.2. CITOQUINAS COMO FACTORES REGULADORES DE LAS INFECCIONES	
PARASITARIAS.....	44
2.2.1. TECNICAS PARA LA DETECCIÓN DE CITOQUINAS	53
2.2.1.1. ELISA sándwich	54
2.2.1.2. ELISPOT.....	56
2.2.1.3. Inmunohistoquímica	59
2.2.1.4. RT-qPCR	62
2.2.1.5. Comparación de las distintas técnicas.....	70
3. CAPITULO I. RESPUESTA CELULAR SUBCUTÁNEA EN EL DORSO	73
3.1. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS ESPECÍFICOS	75
3.2. MATERIAL Y MÉTODOS	76
3.2.1. TOMA DE MUESTRAS.....	76
3.2.2. ANÁLISIS HISTOPATOLÓGICO	77
3.2.3. ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO	78
3.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	80
3.3.1. LESIONES MACROSCÓPICAS	80
3.3.2. HISTOPATOLOGÍA	81
3.3.3. INMUNOHISTOQUÍMICA.....	86
3.3.3.1. Linfocitos B y células IgG ⁺	86
3.3.3.2. Macrófagos	87
3.3.3.3. Linfocitos T.....	89
3.3.3.4. Células productoras de IFN-γ	91

4. CAPITULO II. USO DEL ELISPOT PARA LA DETECCIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE IFN-γ EN LA HIPODERMOSIS BOVINA	93
4.1 ANTECEDENTES Y OBJETIVOS ESPECÍFICOS	95
4.2. MATERIAL Y MÉTODOS	96
4.2.1. ANIMALES Y TOMA DE MUESTRAS	96
4.2.2. OBTENCIÓN Y PURIFICACIÓN DE LOS DISTINTOS ANTÍGENOS DE <i>Hypoderma</i>	97
4.2.3. DESARROLLO DE LA TÉCNICA ELISPOT	99
4.2.4. DETECCIÓN DE IFN- γ EN SOBRENADANTES CELULARES.....	104
4.2.4.1. Cultivos celulares y obtención sobrenadantes.....	104
4.2.4.2. ELISA sándwich	105
4.2.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS	106
4.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	107
4.3.1. DETERMINACIÓN DEL NÚMERO DE CÉLULAS SECRETORAS DE IFN- γ MEDIANTE ELISPOT	107
4.3.1.1. En cultivos de CMSP procedentes de animales no sensibilizados frente a <i>Hypoderma</i>	107
4.3.1.2. En cultivos de CMSP procedentes de animales sensibilizados frente a <i>Hypoderma</i>	111
4.3.1.3. Comparación de la respuesta en animales sensibilizados y no sensibilizados.....	113
4.3.2. DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE IFN- γ MEDIANTE ELISA SÁNDWICH	115
4.3.2.1. En sobrenadantes de cultivos de CMSP procedentes de animales no sensibilizados frente a <i>Hypoderma</i>	115
4.3.2.2. En sobrenadantes de cultivos de CMSP procedentes de animales sensibilizados frente a <i>Hypoderma</i>.....	119
4.3.2.3. Comparación de la respuesta en animales sensibilizados y no sensibilizados.....	124
 5. CAPITULO III. EFECTO REGULADOR DE LAS CITOQUINAS SOBRE LA RESPUESTA CELULAR FRENTE A ANTÍGENOS DE <i>H. lineatum</i>	 127
5.1 ANTECEDENTES Y OBJETIVOS ESPECÍFICOS	129
5.2. MATERIAL Y MÉTODOS	130
5.2.1. ANIMALES Y AISLAMIENTO DE LAS CMSP	130
5.2.2. PREPARACIÓN DEL MITÓGENO Y ANTÍGENOS	131
5.2.3. LINFOPROLIFERACIÓN.....	131
5.2.4. DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE IL-10 EN SOBRENADANTES	133
5.2.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS	133
5.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	133
5.3.1. LINFOPROLIFERACIÓN.....	133
5.3.2. PRODUCCIÓN DE IL-10.....	136

6. CAPITULO IV. DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE CITOQUINAS MEDIANTE RT-qPCR.....	139
6.1. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS ESPECÍFICOS	141
6.2. MATERIAL Y MÉTODOS	142
6.2.1. ANIMALES DONANTES Y CULTIVOS CELULARES	142
6.2.2. EXTRACCIÓN DE ARN DE LOS CULTIVOS CELULARES.....	144
6.2.3. RETROTRANSCRIPCIÓN	145
6.2.5. SELECCIÓN Y PREPARACIÓN DE CEBADORES PARA LAS DISTINTAS CITOQUINAS.....	147
6.2.6. PCR CUANTITATIVA (qPCR)	148
6.2.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS	149
6.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	150
6.3.1. INTERFERON GAMMA (IFN- γ)	150
6.3.2. INTERLEUQUINA 10 (IL-10)	155
6.3.3. FACTOR DE NECROSIS TUMORAL ALFA (TNF- α)	159
6.3.4. INTERLEUQUINA 4 (IL-4)	163
6.3.5. COMPARACIÓN DEL PATRÓN DE EXPRESIÓN DE CITOQUINAS EN CMSP DE ANIMALES SENSIBILIZADOS Y NO SENSIBILIZADOS	168
6.3.6. COMPARACIÓN DE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN Y SECRECIÓN DE CITOQUINAS.....	170
7. CONCLUSIONES/ CONCLUSIONS	171
8. RESUMEN/RESUMO/SUMMARY.....	177
9. BIBLIOGRAFÍA.....	189





1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS GENERALES



Las larvas de *Hypoderma* spp son parásitos obligados que migran y se alimentan durante varios meses de los tejidos del hospedador. Las larvas de primer estadio penetran a través de la piel y migran por el tejido conjuntivo con ayuda de las secreciones enzimáticas de sus glándulas salivales (Boulard, 1969) hasta la submucosa esofágica en el caso de *H. lineatum* y la grasa epidural para *H. bovis*. Tras un periodo de reposo en estas localizaciones, las larvas 1 (L1) reanudan su migración hacia el tejido subcutáneo del dorso, donde se produce la primera muda larvaria que implica la expulsión del contenido del intestino medio originando un orificio en la piel y dando lugar a una respuesta inflamatoria que encapsula a las L2 y L3 con tejido conectivo y genera los característicos nódulos larvarios (Berkemkamp y Drummond, 1990).

La trascendencia económica de esta miasis se ha ignorado durante mucho tiempo, y aunque los síntomas son poco evidentes, su presencia es responsable de pérdidas muy considerables basadas en la reducción de producción de leche, menor ganancia de peso, depreciación de las canales y deterioro de las pieles, así como las debidas al efecto favorecedor de otras infecciones. En las últimas décadas la importancia de la hipodermosis en nuestro país ha sido señalada en diversos estudios efectuados en Galicia (Morrondo *et al.*, 1999; Panadero *et al.*, 2007, Cabanelas *et al.*, 2013), Andalucía (Martínez-Gómez *et al.*, 1988; Martínez-Moreno *et al.*, 1992) y Extremadura (Reina *et al.*, 1994), de modo que a pesar de la existencia de fármacos eficaces para el tratamiento de la hipodermosis, su uso esporádico y sin pautas correctas no se ha traducido en un descenso significativo en el contacto del ganado vacuno con el parásito.

Gracias al estudio de las secreciones de las larvas 1 se han descrito y caracterizado tres serin-proteasas denominadas hipodermina A, B y C (Boulard y Garrone, 1978; Lecroisey *et al.*, 1983) que están implicadas en la regulación de la respuesta inmunitaria por parte del hospedador. El efecto inmunomodulador de estas proteínas contribuye a la supervivencia del parásito durante su migración a través del tejido conectivo del hospedador. La patogenia de la hipodermosis se relaciona con la edad y el estado inmunitario de los animales; se ha comprobado que el ganado vacuno desarrolla cierta resistencia tras repetidas exposiciones a las larvas de *Hypoderma* spp., como lo demuestra el hecho de que los animales jóvenes presenten, por lo general, un número de nódulos larvarios significativamente superior respecto de los de más edad.

Esta respuesta constituye un factor importante en el control de las poblaciones del parásito, comprobándose que es dependiente del número de exposiciones previas y del número de larvas que infesten al hospedador. Así, en animales primoinfestados apenas existen lesiones en el tejido conjuntivo que rodea a las larvas, mientras que en las reinfestaciones, están rodeadas por áreas edematosas y con abundantes infiltrados de eosinófilos y linfocitos.

La respuesta humoral se ha estudiado ampliamente, habiéndose desarrollado técnicas de diagnóstico precoz, encaminadas a detectar anticuerpos y/o antígenos parasitarios (Boulard y Weintraub, 1973; Boulard y Bencharif, 1984; Panadero *et al.*, 2001; Colwell *et al.*, 2003). No obstante, es manifiesta la ausencia de relación entre los niveles de inmunoglobulinas séricas y el grado de resistencia alcanzado por los animales (Pruett y Barrett, 1985; Panadero, 1996), por lo que se sugiere que la respuesta celular, que ha sido menos investigada hasta el momento, juega también un papel muy importante en la respuesta protectora frente a esta parasitosis. En este sentido, Nelson y Weintraub (1972) denunciaron evidencias de que la respuesta celular estaba implicada en la inmunidad frente a *Hypoderma*, como lo demostraba la fuerte reacción celular producida tras la penetración de las larvas, que es más evidente en animales reinfestados. Por su parte, Baron y Weintraub (1986) al estudiar la respuesta linfoproliferativa en animales primo y reinfestados, sugirieron que la resistencia adquirida frente a la hipodermosis presenta una base celular y que en ella participan células T y B.

El papel de las citoquinas en la regulación y modulación de la respuesta inmune ha sido ampliamente estudiado en humanos y ratones desde la postulación del paradigma Th1/Th2. Este paradigma propone que, tras un primer contacto con un antígeno, se produce una tendencia de las células T colaboradoras hacia dos respuestas distintas (Th1 y Th2) que pueden distinguirse por la expresión de determinadas citoquinas. Mientras que el IFN- γ , el TNF- α y la IL-12 son considerados citoquinas claves en la respuesta Th1, y sirven de indicadores de la respuesta de tipo celular, la IL-4 participa en la aparición Th2 y su secreción sugiere un predominio de la respuesta humoral. Con respecto a la IL-10, se estima que puede participar en ambos tipos de respuesta, presentando un efecto regulador.

En los últimos años, la lucha frente a la hipodermosis bovina se ha centrado únicamente en la administración de fármacos, cuyo uso plantea diversos problemas, tanto para los animales (toxicidad, dosificación y periodos de aplicación, etc.), como para la salud humana (presencia de residuos en leche y carne). Por otra parte, la falta de eficacia de las vacunas ensayadas, basadas en distintas fracciones antigénicas del parásito, sugiere la participación de otras moléculas y de la activación de mecanismos más complejos en el desarrollo de protección por parte del hospedador. De ahí que la búsqueda de nuevas estrategias de lucha vaya orientada a reforzar mecanismos naturales de defensa del hospedador.

Actualmente existe poca información sobre el tipo de respuesta inmunitaria responsable de la inmunidad protectora frente a *Hypoderma* en ganado vacuno, especialmente durante la fase subcutánea del dorso. Por otro lado y dada la relevancia de las citoquinas como moduladores de la respuesta del hospedador, resulta fundamental estudiar el efecto de los distintos antígenos del parásito sobre su producción, recurriendo para ello técnicas inmunoenzimáticas y de biología molecular que, si bien se emplean ampliamente en investigación en humanos o animales de experimentación, en cambio, son escasas las referencias existentes en animales de renta y, sobre todo, en ganado vacuno.

Teniendo en cuenta los antecedentes expuestos, planteamos un estudio encaminado a conseguir los siguientes **OBJETIVOS GENERALES**:

1. Estudiar la respuesta inmunitaria celular a nivel local en la fase subcutánea del dorso del ciclo de *Hypoderma* spp. en ganado vacuno infestado de forma natural.
2. Poner a punto técnicas inmunológicas (ELISPOT) y moleculares (RT-qPCR) para la detección de citoquinas de tipo Th1 y Th2 en linfocitos de ganado vacuno.
3. Establecer diferencias en el patrón de producción de citoquinas en animales primo y reinfestados por *Hypoderma*.
4. Analizar las correlaciones entre los niveles de expresión y secreción de las distintas citoquinas durante la infestación por *Hypoderma*.

5. Estudiar mediante ensayos *in vitro* las interacciones entre las diferentes citoquinas y su papel regulador en el desarrollo de inmunidad protectora frente a *Hypoderma* spp.





2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA



2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2. 1. HIPODERMOSIS

2.1.1. AGENTE ETIOLÓGICO

De las seis especies incluidas en el género *Hypoderma* (Zumpt, 1965), sólo dos parasitan de forma obligada al ganado vacuno, *Hypoderma bovis* (de Geer, 1776) e *Hypoderma lineatum* (de Villiers, 1789), denominadas mosca “grande” y “pequeña” de los bóvidos, respectivamente. Las moscas del género *Hypoderma* poseen una gran especificidad por su hospedador aunque se han citado casos de parasitación en otras especies. En la India, Saravanan *et al.* (2006) describieron una infestación por *H. lineatum* en un yak (*Poephagus grunniens*). Ese mismo año, Colwell y Otranto (2006) infectaron cabras de forma experimental con larvas 1 de *H. lineatum*, comprobando que los animales desarrollaban anticuerpos frente al parásito siendo posible detectar antígenos larvarios en suero mediante inmunoblotting. No obstante, el parásito era incapaz de completar el ciclo, hecho demostrado por la ausencia de nódulos larvarios en el dorso.

2.1.1.1. Morfología de los distintos estadios de desarrollo

Las **moscas adultas** (imagos) de *Hypoderma* spp. poseen en el abdomen un revestimiento piloso abundante, de aspecto estriado, formando tres anillos de color; la cabeza es fuerte y más ancha que la parte anterior del tórax; los ojos están bien desarrollados y separados; sus piezas bucales son afuncionales (Zumpt, 1965). El abdomen es más estrecho que el tórax y en las hembras, el último segmento está modificado formando el ovipositor, que sirve para depositar los huevos sobre los pelos de los bovinos. Poseen dos alas pardo-grisáceas y tres pares de patas (Figura 2.1).



Figura 2.1. Mosca adulta de *Hypoderma lineatum*

Los adultos son muy móviles y rápidos; en estado de reposo la cabeza está más alta, de modo que su postura respecto del plano horizontal es típicamente inclinada con las alas divergentes.

H. bovis mide de 12 a 16 mm de longitud; es la llamada “mosca grande” de los barros. Es muy similar a un abejorro, ya que su cuerpo está recubierto de abundante pilosidad en cabeza, tórax y abdomen (Gil-Collado, 1961). El primer segmento abdominal es gris con pelos blancos o amarillentos; el segundo es más oscuro, casi negro y el tercero, amarillo oscuro. Sus alas son grandes y de color gris no transparente (Zumpt, 1965). Las patas son lisas y poco pilosas.

H. lineatum es la “mosca pequeña” de la hipodermosis, llamada también “mosca de la pezuña o de las cuartillas”. Los machos miden hasta 12 mm y las hembras no sobrepasan los 13 mm. Las pilosidades del tórax son blanco-amarillentas y en el abdomen los pelos se disponen formando una banda amarilla clara que alterna con otra más oscura y finaliza con una anaranjada. Sus alas son transparentes y las patas tienen abundante pilosidad oscura y son rugosas. Poseen un par de antenas entre los ojos, compuestas por tres segmentos de distinto tamaño; un segmento proximal, un pedículo y un funículo distal. A pesar de que todos están recubiertos por microtriquias y mecanoreceptores, es en la parte distal donde se localizan la mayor parte de receptores sensoriales, agrupados en las denominadas “fosas sensoriales” (Li *et al.*, 2015).

En ambas especies, los **huevos** son de color blanco, sin opérculo y de forma alargada. Se fijan a la base del pelo por un pequeño pedúnculo flexible con dos

ramificaciones laterales de sustancia gelatinosa con la que se adhieren firmemente en posición oblicua respecto al pelo, dificultando su separación del mismo (Cogley y Anderson, 1981). Los huevos de *H. bovis* miden 1 mm y se disponen de forma individual en cada pelo. Los de *H. lineatum* son ligeramente más pequeños y se sitúan en el mismo pelo en hileras de 5 a 15 huevos.

Las larvas eclosionadas o **larvas 1** (L-1) son muy delgadas, fusiformes y con los extremos redondeados. Son totalmente transparentes, apreciándose bien sus órganos internos; el tubo digestivo está constituido por el esófago o intestino anterior al que se unen dos glándulas salivares; se prolonga con el intestino medio repleto de líquido amorfo ligeramente verdoso que dilata y da turgencia a la larva. El intestino medio se encuentra obstruido caudalmente por una masa celular que lo separa del intestino posterior.

Su cuerpo está dividido en 11 segmentos casi iguales, con espinas de distinto tamaño que se disponen en filas irregulares dirigidas hacia atrás, lo que les impide retroceder cuando se desplaza por los tejidos del hospedador. La L-1 recién eclosionada mide menos de 1 mm; a su llegada a las zonas de reposo invernal (submucosa esofágica y canal raquidiano) alcanza 5 mm, sobrepasando al final de su migración los 15 mm (Arru *et al.*, 1985; Panadero *et al.*, 2007a). A medida que las L-1 aumentan de tamaño, se observan cambios en su tegumento, entre los que se encuentran el adelgazamiento de la procutícula y epicutícula y el incremento del número de laminillas, debido a la proliferación de células basales (Colwell, 1991).

En el extremo anterior posee un aparato bucal o esqueleto cefálico, compuesto por un espolón medial y dos ganchos laterales cuya forma es diferente en ambas especies, haciendo posible su identificación. Mientras que los ganchos bucales de *H. lineatum* poseen un extremo anterior afilado no dividido y con un diente lateral curvado, los de *H. bovis* están divididos en su extremo anterior y no poseen diente lateral (Weintraub *et al.*, 1968). En el extremo final, las L-1 de ambas especies, poseen dos placas estigmáticas que consisten en dos pares de aberturas espiraculares, cada una de ellas rodeada por un anillo con 3 espinas (Colwell, 1989).

Las **larvas 2** son más redondeadas, más anchas en su parte central y estrechándose en los extremos anterior y posterior. Alcanzan 10-16 mm de largo y 4-5

mm de diámetro; son de color amarillo-blanquecino y realizan movimientos contráctiles. Presentan espinas cuticulares fuertes que se aprecian mejor en las fases más jóvenes. Su aparato bucal ha evolucionado y están desprovistas de ganchos bucales. Su aparato respiratorio está adaptado a la vida aerobia, con dos placas estigmáticas posteriores de forma circular que constan de varios anillos. Mediante microscopía electrónica, Colwell (1989) puso en evidencia la presencia de 29 a 40 aberturas en las placas respiratorias de las L-2 de *H. bovis*, mientras que las de *H. lineatum* poseen tan solo entre 18 y 25.

Las **larvas 3** (figura 2.2) son gruesas y presentan forma de tonel; miden entre 2,5 y 3 cm de largo y 1,4-1,7 cm de diámetro (Borchert, 1964); su cara ventral es convexa y la dorsal ligeramente plana o cóncava. Su cuerpo está dividido en 11 segmentos, la mayor parte de los cuales lleva en la parte anterior de la cara ventral una línea de espinas gruesas, oscuras y dirigidas hacia atrás y en la parte posterior una banda de pequeñas espinas quitinosas, dirigidas hacia delante. La parte ventral anterior del décimo segmento de las L-3 de *H. bovis* no tiene espinas, mientras que en *H. lineatum* sí son visibles (Lapage, 1968). Las espinas están menos desarrolladas en la cara dorsal (Zumpt, 1965).



Figura 2.2. Larvas 3 de *Hypoderma* spp. en distintas fases de desarrollo

Con microscopía electrónica de barrido, se ha estudiado en detalle el patrón de distribución de las espinas cefálicas y torácicas, así como la forma de las placas

respiratorias y de la sutura opercular, lo que ha permitido diferenciar con claridad las especies que afectan a los bóvidos (Colwell, 1989; Colwell *et al.*, 1998).

En el caso de *H. bovis*, la primera banda de espinas del segmento cefálico, situada entre la boca y la sutura opercular es siempre evidente; en *H. lineatum*, esta banda es variable entre ejemplares, presentando mayor o menor número de espinas. En lo que concierne a las espinas caudales, las de *H. bovis* son paralelas y se estrechan en la punta y las de *H. lineatum* tienen un extremo romo y se estrechan desde la base (Colwell *et al.*, 1998).

Las L-3 de *Hypoderma* spp., al igual que las L-2, son aerobias y respiran a través de unos estigmas u orificios respiratorios localizados en las placas respiratorias del último segmento. La forma de las placas y la disposición de los orificios respiratorios varían de una especie a otra. En *H. bovis*, las placas respiratorias son redondeadas y se encuentran profundamente incurvadas en su centro con un canal de separación largo y estrecho; cada una de ellas está dividida en 10 septos, los cuales presentan hasta una treintena de orificios respiratorios, rodeados por un pequeño anillo que normalmente lleva una espina. En el caso de *H. lineatum*, las placas respiratorias son más planas, el canal de separación más abierto y están divididas en 7 septos, cada uno de los cuales posee menos de 30 estigmas rodeadas por un anillo que no lleva espinas (Colwell, 1989).

El color de las L-3 depende mucho de su momento de desarrollo; al principio es pardo amarillento, posteriormente se va oscureciendo considerablemente hasta hacerse marrón oscuro o negruzco poco antes de abandonar el hospedador. Así, Scholl *et al.* (1989) establecieron, en base al color de la cutícula y desarrollo de los espiráculos respiratorios, tres fases en el desarrollo de las larvas 3 de *Hypoderma* spp. En la fase más temprana (P1), las larvas son aparentemente blancas y sus placas respiratorias posteriores están sin pigmentar; al final de esta fase, la cutícula ya es amarilla y, los márgenes de las placas respiratorias comienzan a melanizarse. En la segunda fase (P2) las placas estigmáticas se oscurecen progresivamente, de modo que al comienzo de la última fase (P3) la larva ya posee una cutícula oscura, aunque no tanto como cuando están a punto de salir para la pupación. Las placas respiratorias posteriores están ya completamente desarrolladas y melanizadas.

Cabanelas *et al.* (2013) comprobaron que el tamaño de las L-3 durante su permanencia en el dorso de los animales no aumenta de forma significativa, mientras que sí existe una relación entre el color de la cutícula y el desarrollo de las placas espiraculares.

Las larvas 3 que caen al suelo quedan inmóviles, su cutícula se endurece considerablemente y forman las **pupas** o puparios. El color de las pupas es prácticamente negro, están aplanadas por su parte anterior y tienen un opérculo bien visible por el que saldrá la mosca adulta después de la pupación (Zumpt, 1965). La pupa tiene una longitud de 2-2,8 cm por 1,4-1,8 cm de grosor, siendo algo menor la de *H. lineatum* y en ella se ven las protuberancias, a modo de espinas, mejor que en la de *H. bovis*.

2.1.1.2. Ciclo biológico

Las moscas adultas de *Hypoderma* spp. abandonan el pupario al cabo de 2-5 semanas, para ello levantan el opérculo de la pupa mediante la vesícula cefálica y emergen coincidiendo con las horas más soleadas del día. Los adultos tienen las piezas bucales atrofiadas y por ello no se alimentan durante la fase de vuelo (Zumpt, 1965). Su vida es muy corta y depende de las reservas acumuladas a lo largo del desarrollo larvario, cuyo agotamiento se asocia, en gran medida, a la temperatura; la mayoría de los autores (Pfadt *et al.*, 1975; Boulard *et al.*, 1988; Benakhla *et al.*, 1993) señalan para los adultos de *Hypoderma* una vida media de 3-4 días, y raramente superan los 8 días.

Las moscas se desplazan activamente recorriendo distancias que a veces superan los 5 km. En general, no penetran en los establos ni en los locales cerrados y siempre se aproximan a los animales en los pastos y en espacios abiertos.

La cópula se realiza poco después de que la mosca abandone el pupario y tiene lugar generalmente en el suelo, aunque en algunas ocasiones se ha observado en pleno vuelo (Weintraub, 1961; Hurtado, 1999).

Las hembras de *Hypoderma* realizan un vuelo corto, rápido y especialmente ruidoso, provocando estampidas en ocasiones. Según Scholl y Weintraub (1988), estas

tienen adaptaciones muy particulares para compensar su corto periodo de vida. Por un lado, el comienzo de la ovogénesis ya tiene lugar durante la fase de larvas 3 (L-3) y de pupas. Por otro, tiene lugar el desarrollo simultáneo de dos oocitos en el mismo ovario, lo cual duplica la capacidad reproductora. Además, una vez fecundada, cada hembra puede depositar entre 500 y 1000 huevos, llegando incluso a poner hasta 100 huevos sobre un mismo animal.

El comportamiento de la puesta es diferente en las hembras de las dos especies que afectan al ganado bovino; así *H. bovis* deposita los huevos durante el vuelo, causando un gran desconcierto en los animales por el sonido que emite, similar al de una abeja; la puesta se produce en los miembros posteriores del bovino y en lugares fácilmente accesibles para la mosca (desde las cuartillas al bajo vientre, en las proximidades de la ubre y también en la parte baja del pecho y papada); debido a que depositan un huevo cada vez, han de multiplicar el número de visitas al hospedador. Por el contrario, *H. lineatum* molesta menos al hospedador durante la ovoposición, donde cada vez deposita de 6 a 15 huevos dispuestos en hileras, preferentemente en los pelos de los miembros anteriores, papada y nacimiento del cuello. De acuerdo con Colwell y Berry (1993), las hembras de *H. bovis* poseen más receptores químicos y mecánicos que las de *H. lineatum*, y debido a su forma de puesta tienen más dificultades para localizar al hospedador.

En el interior del huevo el embrión permanece inmóvil hasta que eclosiona a los 3-4 días de la puesta; la salida se produce a través de una fisura que se abre en la cubierta del huevo por acción directa de la larva. Las L-1 recién eclosionadas descienden por el pelo con movimientos ondulatorios vermiformes, guiadas por estímulos térmicos. Karter *et al.* (1992) demostraron que las larvas recién eclosionadas presentaban termotaxia positiva pero no fototaxia ni geotaxia. Posteriormente, las larvas penetran activamente en el tejido subcutáneo, aprovechando frecuentemente el espacio que rodea a los folículos pilosos; a esto contribuye el esqueleto cefálico, las enzimas proteolíticas y las espinas quitinosas que recubren su cuerpo.

La migración de las larvas 1 por los tejidos del hospedador se produce con ayuda de las enzimas presentes en sus secreciones salivales (Boulard *et al.*, 1988). Estas enzimas, después de haber destruido los tejidos, son reabsorbidas a través de la cutícula y se acumulan en el intestino medio.

La migración intraorgánica de las L-1 difiere con la especie de que se trate. *H. lineatum* se desplaza por el tejido conjuntivo laxo intermuscular de la parte anterior del pecho y del abdomen, siguiendo líneas paralelas a los vasos sanguíneos, aunque no penetra en ellos ni en los músculos, hasta la submucosa esofágica, preferentemente en su tercio caudal, que es su lugar de estacionamiento o “reposo invernal”. También es frecuente encontrarlas en otros lugares distintos de la submucosa esofágica como el tejido conectivo peritraqueal y periesofágico, pleura parietal y peritoneal, pericardio, peritoneo visceral del hígado, bazo, rumen e intestino, diafragma, músculos intercostales y tejido conjuntivo perirrenal (Pancieri *et al.*, 1993).

Durante esta fase de reposo, las larvas aumentan hasta seis veces su tamaño, llegando a alcanzar los 12 mm de longitud. Cox *et al.* (1970), Panadero *et al.* (2007a) y Quintero-Martínez *et al.* (2007) comprobaron que, tanto las larvas situadas en la submucosa esofágica como las observadas en la superficie externa del esófago y tráquea, estaban orientadas longitudinalmente a estos órganos y que su tamaño se iba incrementando de forma paralela, por lo que se puede considerar que estas larvas periesofágicas no se encontraban de paso hacia la submucosa esofágica sino que completaban su desarrollo en esta posición.

Las larvas de *H. bovis* realizan una emigración calificada por Ruíz (1982) como “órgano-neurotrópa”, en la que migran lentamente siguiendo los ejes conjuntivo-nerviosos, desplazándose en paralelo a los nervios isquiático y radial hasta alcanzar los plexos sacro, lumbar y braquial, tardando en llegar unos 4 meses. El lugar de reposo de *H. bovis* es la grasa epidural del canal raquídeo, especialmente de la región torácica y lumbar, entre la 8ª vértebra torácica y la 6ª lumbar. Estas larvas entran y salen del canal medular a través de los orificios intervertebrales (Beesley, 1962).

Después del reposo en el raquis o en el esófago, las L-1 de *Hypoderma* reinician su migración hacia los lugares de maduración bajo la piel del dorso, donde mudan dos veces. Cuando mudan a L-2 invierten su posición y liberan todo el contenido enzimático a través del intestino posterior, lo que provoca un orificio en la piel del hospedador de 1 a 3 mm de diámetro, a través del cual se ponen en contacto con el exterior e inician una etapa aerobia; posteriormente se produce la muda a L-3.

La primera muda larvaria estimula la formación de una reacción granulomatosa por parte del hospedador, rodeando a la larva, y formando un nódulo, también denominado “barro” o “bubón”. Las larvas 2 y 3 se nutren de restos tisulares y del contenido purulento del granuloma, creciendo muy rápidamente ya que en tres meses han de acumular las reservas necesarias para la pupación (1 mes) y para la vida adulta, periodos durante los cuales el insecto ya no se alimenta. Boulard (1969) y Boulard *et al.*, (1988) observaron que el tubo digestivo de la L-1 está abierto en los dos extremos, y posee una dotación enzimática rica en proteasas. Mediante pruebas radiactivas, Kasting y McGinnis (1966) establecieron algunos de los requerimientos nutricionales de las L-3 de *H. bovis*, comprobando que la metionina, fenilalanina, tirosina, leucina, histidina, lisina, isoleucina, valina y treonina son esenciales para su nutrición.

Borchert (1964) señala que el tiempo medio de permanencia de las larvas en los nódulos varía según la especie; para *H. bovis* se prolonga 11 semanas (varía entre 8,5-14 semanas), mientras que para *H. lineatum* es de 7,5 semanas (oscila entre 6-9 semanas).

Cabanelas *et al.* (2013) comprobaron que el color de la cutícula y de las placas espiraculares de las L-3 pueden emplearse como indicadores fiables de la viabilidad de las larvas en el medio, pero no ocurre lo mismo con el tamaño de las mismas.

Cuando las larvas se han desarrollado, abandonan los nódulos a través del orificio por el que respiran ayudadas por las contracciones de la musculatura del hospedador y de la propia larva, caen al suelo y penetran en su interior o se ocultan entre la vegetación, donde se inicia el período de pupación. Aunque las larvas de ambas especies son lucífugas, las de *H. lineatum* penetran en el suelo más profundamente que las de *H. bovis*. Tras el endurecimiento de la cutícula se produce una compleja metamorfosis que, en aproximadamente 3-10 semanas, dependiendo de las condiciones climáticas, dará lugar a la mosca adulta.

2.1.1.3. Cronobiología de *Hypoderma* spp.

El ciclo vital de *Hypoderma* spp., sobre todo las fases que se desarrollan fuera del hospedador, está íntimamente relacionado con las características climáticas de la zona.

La programación de campañas de lucha y erradicación de la hipodermosis en una determinada región debe apoyarse en el conocimiento previo de los períodos aproximados en los que tienen lugar las distintas fases del ciclo y las adaptaciones resultantes de las condiciones climáticas anuales; esto adquiere especial importancia en el caso del tratamiento preventivo, ya que ha de administrarse al ganado vacuno cuando actividad de las moscas adultas haya cesado, y antes de que las L-1 alcancen los lugares de estancia invernal.

Martínez-Gómez *et al.* (1988) afirman que la cronobiología de la hipodermosis varía de un año a otro con las condiciones climáticas; dependiendo si la pluviosidad es temprana o tardía o si las temperaturas durante los meses de primavera u otoño son altas o bajas. El ciclo se adelantará más cuanto más suaves sean las temperaturas primaverales e invernales y más altas sean las veraniegas.

La distribución de las 2 especies de *Hypoderma* difiere según el área geográfica, aunque en una misma zona pueden coexistir los dos ciclos, si bien normalmente no se superponen completamente en el tiempo. En conjunto, el ciclo dura 8-11 meses y, en condiciones normales, sólo hay una generación de moscas al año. En climas templados el ciclo de *H. lineatum* se adelanta uno o dos meses respecto al de *H. bovis* (Pfadt, 1947; Tarry, 1981; Boulard *et al.*, 1988; Berkemkamp y Drummond, 1990) y estas diferencias pueden ampliarse en zonas con condiciones climáticas extremas, como sucede al este de las Montañas Rocosas en América del Norte (Scharff, 1950), o en regiones áridas de Irak (Abul-hak, 1973).

En España, Talegón (1969), Martínez-Gómez *et al.* (1988) y Panadero (1996) realizaron un seguimiento del ciclo biológico de las dos especies de *Hypoderma* y observaron que el vuelo y el periodo de puesta de *H. lineatum* se adelantaba al menos 1-2 meses con respecto a *H. bovis*.

En el sur de España la cronobiología de *Hypoderma* se aproxima más a la señalada para los países norteafricanos. Así, Martínez-Gómez *et al.* (1988) comprobaron que las moscas estaban activas desde febrero a finales de mayo, observando las L-1 en el esófago y raquis desde principios de abril hasta mediados de enero y los barros en tejido subcutáneo del dorso entre mediados de noviembre y finales de mayo. Reina *et al.* (1994) comprobaron que desde octubre a abril era posible detectar L-3 en el dorso del ganado. La

aparición de moscas se concentraba entre los primeros días de marzo y comienzos de mayo, mientras que las L-1 de *H. lineatum* podían observarse en los esófagos desde septiembre a diciembre. Asimismo, Hurtado (1999), en la Alta Extremadura, observó que las larvas 3 estaban presentes desde octubre hasta mayo, mientras que el período en que pueden observarse las L-1 de *H. lineatum* en el esófago va de septiembre a diciembre, ambos inclusive.

En la provincia de León, Cordero (1962) observó que la presencia de adultos de *H. bovis* y la puesta de los huevos se efectuaba entre finales de junio y mediados de septiembre, mientras que la emigración larvaria a lo largo de los nervios hacia la zona subcutánea del dorso, tenía lugar entre julio y febrero.

En la mayor parte de Galicia, según Díez *et al.* (1995) y Panadero (1996), la cronobiología de la hipodermosis se ajusta al siguiente modelo: desde mediados de mayo a septiembre tiene lugar el vuelo de las moscas, la puesta de los huevos y el inicio de la migración larvaria. Entre agosto y finales de diciembre, las larvas 1 se encuentran en los lugares de estancia invernal. Desde octubre hasta enero, se completa la migración larvaria hacia el dorso y entre diciembre y abril se detectan la mayoría de los nódulos larvarios subcutáneos. No obstante, como ya se ha señalado anteriormente, esta cronología varía de un año a otro en función de la climatología; así, Panadero (1996) observó que en los años en que las condiciones climáticas eran favorables para el ciclo de *Hypoderma*, éste se adelantaba 1 ó 2 meses respecto a los de meteorología más adversa.

Por otro lado, Panadero *et al.* (2007a) realizaron un seguimiento de larvas 1 de *H. lineatum* en esófagos de ganado vacuno sacrificado en la provincia de Lugo, determinando que no existen diferencias significativas en la prevalencia larvaria en función del clima y que, la prevalencia es menor en zonas costeras que en el interior, donde las larvas fueron de menor tamaño. Recientemente, Panadero *et al.* (2012) señalaron que en el noroeste de España las larvas 2 y 3 de *H. lineatum* están presentes en el tejido subcutáneo del dorso en invierno, alcanzando los valores más altos en el mes de febrero. El momento de máxima emergencia de las larvas 3 se observó en marzo, por lo que se puede asumir que en esta área las moscas ya podrán estar activas en los meses de marzo o abril.

2.1.2. PATOGENIA

La infestación por larvas de *Hypoderma* provoca importantes efectos nocivos en los tejidos del hospedador, debidos sobre todo a la acción mecánica ejercida por sus apéndices cefálicos y también a la acción proteolítica e inmunitaria de sus secreciones salivales (Lecroisey *et al.*, 1983). Esta acción patógena está condicionada por la intensidad de parasitación y por la resistencia de los hospedadores lo que, a su vez, está relacionado con otros factores como contactos previos con las larvas parásitas y el estado sanitario general de los animales.

Las larvas que salen de los huevos atraviesan activamente la piel del animal, aprovechando la depresión que rodea los folículos pilosos. Si transcurridos unos minutos no han encontrado un lugar apropiado para la penetración, se desecan, pierden su movilidad y mueren sin lograr su objetivo. El líquido incoloro que rodea a las larvas recién eclosionadas, además de impedir su pronta desecación, también contribuye según Nelson y Weintraub (1972), a la lisis enzimática de los tejidos, en la que también toman parte activa los apéndices cefálicos o cefalo esqueleto de las L-1 y las espinas quitinosas que las recubren.

Las L-1 de *Hypoderma* spp. utilizan las enzimas segregadas por sus glándulas salivales para lisar y digerir el tejido conjuntivo e inhibir la formación de fibrina, limitando la posibilidad de enquistamiento. En este sentido, Boulard (1969) indicó que la digestión tiene lugar fuera de la larva, y posteriormente esta reabsorbe parcialmente sus enzimas junto con los productos de degradación del tejido del hospedador y los almacena en el intestino medio, que está cerrado en su extremo final por un tapón celular. Estas enzimas son sintetizadas durante la fase migratoria, desde que salen de los huevos hasta que mudan a L-2 en el dorso del hospedador. La digestión realizada por las enzimas cumple al menos dos fines: la nutrición de la larva, mediante la predigestión de los tejidos próximos, y la protección del parásito frente a reacciones inflamatorias del hospedador.

Una vez atravesada la piel, las larvas inician la emigración por el tejido conjuntivo hasta llegar a la submucosa esófagica en el caso de *H. lineatum* y a la grasa epidural en el canal medular en el de *H. bovis*. Durante la migración, las larvas además

de desplazarse y aumentar su tamaño, dejan tras de sí trayectos gelatinosos y hemorrágicos con abundantes infiltrados leucocitarios.

En los lugares de reposo, la reacción del hospedador difiere dependiendo de si se trata de una primoinfestación o reinfestación. Según Boulard (1985), con las infestaciones sucesivas la reacción perilarvaria en la mucosa esofágica se intensifica de modo considerable. Tras su permanencia en estas localizaciones, las larvas 1 emprenden de nuevo la migración hasta alcanzar la posición subcutánea en el dorso del hospedador y allí mudar a larva 2 y 3.

Después de la primera muda larvaria, se establece comunicación entre la parte del intestino medio y la posterior, lo que permite la expulsión del contenido acumulado durante la fase de primer estadio larvario; la liberación de estas enzimas en el tejido subcutáneo del hospedador conlleva lisis de la dermis y la epidermis, lo cual facilita el contacto de los espiráculos respiratorios con el exterior.

Según Berkenkamp y Drummond (1990), la muda de las L-1 en el dorso propicia una reacción granulomatosa que tiende a encapsular al segundo y tercer estadio larvario con un tejido conectivo fibroso denso que rodea totalmente la larva dentro de un nódulo que la aísla del sistema inmune del hospedador. Beesley (1966) afirma que las L-3 están en un ambiente relativamente aislado y estable, evitando infecciones secundarias al disponer de sustancias bacteriostáticas. De acuerdo con Boulard (1979), no parece existir comunidad antigénica entre las larvas de los tres estadios.

Finalmente, la salida de la larva 3 y consiguiente perforación de la piel del dorso, puede ser una vía de entrada de patógenos, pudiendo originar abscesos que afectan incluso a los músculos próximos. Asimismo, se forma tejido cicatricial que lleva consigo depreciación de las pieles después del curtido.

2.1.3. MANIFESTACIONES CLÍNICAS

Las manifestaciones clínicas de la hipodermosis se evidencian durante la fase de puesta de las moscas o en la fase subcutánea, cuando empiezan a aparecer las larvas en el dorso en forma de nódulos dolorosos a la palpación. Por el contrario, son menos evidentes durante la migración intraorgánica de las larvas. Por este motivo, se considera

a esta miasis como una “enfermedad zootécnica”, que cursa con escasa sintomatología pero que, se manifiesta por una reducción de las producciones. Dicha reducción será tanto más importante cuanto mayor sea la intensidad de parasitación, aunque las pérdidas totales debidas a esta parasitosis no son fácilmente cuantificables.

El sonido producido por las moscas al volar, similar al zumbido de una abeja, causa temor y reflejo de huida en los animales, provocándose lesiones con cercas, paredes o alambradas, caídas, abortos, etc., al tratar de buscar refugio. Las carreras y desplazamientos bruscos de los animales se contagian al rebaño y dan lugar a auténticas estampidas. La excitación es más importante con *H. bovis* por el modo de puesta individual que realiza, que supone el vuelo constante alrededor de los animales.

Como se mencionó anteriormente, las manifestaciones clínicas durante la fase de migración son escasamente aparentes y se traducen en un retraso del crecimiento de los animales más jóvenes y pérdida de peso de los adultos, resintiéndose especialmente la producción láctea. Por otra parte, pueden detectarse también disfagias pasajeras ante la inflamación de la pared esofágica. Cuando las larvas que migran por el peritoneo son numerosas, hay peritonitis y cojeras pasajeras o paresias de distinta intensidad, dependiendo de la localización de las larvas y sus fases de desarrollo.

En caso de infestaciones importantes, la sintomatología es más evidente debido en buena medida a la liberación masiva de enzimas durante la migración de las larvas, presentándose con mayor intensidad en casos de tratamiento incorrecto. Las manifestaciones clínicas incluyen fuerte salivación, esofagitis, problemas digestivos con meteorización aguda, temblores y estado apático con evolución normalmente favorable en 24-48 horas (Boulard *et al.*, 1991; Levasseur, 1991).

Eyre *et al.* (1981) comprobaron que la inoculación de un extracto de larvas 1 de *H. lineatum* filtrado y purificado en los bovinos jóvenes produce alteraciones cardiorrespiratorias, observándose hipotensión carotídea e hipertensión arterial, disnea y dificultades respiratorias.

La presencia de las larvas en el dorso origina forunculitis más o menos intensa dependiendo del grado de inflamación. Esta patología está acompañada de reacción

dolorosa, prurito y malestar general, más acentuado en los animales jóvenes con infestaciones importantes. En los adultos, estas manifestaciones son menos evidentes.

Con la salida de las larvas, en los meses de primavera-verano, la pequeña herida cicatriza rápidamente y se recupera el estado general, a lo que contribuye también la mejora de los pastos en ese período.

Igualmente, se sabe que las enzimas segregadas por las larvas durante su migración desempeñan un papel esencial para la supervivencia de las L-1 debido a una acción antiinflamatoria e inmunomoduladora. Esta acción que garantiza el éxito de la infestación, también puede favorecer el desarrollo de otros procesos patógenos. En este sentido, Araujo-Chaveron (1994) señalaron la probable influencia negativa de *Hypoderma* sobre el funcionamiento normal del sistema inmune de los bovinos y advirtieron que la hipodermosis se correlaciona con un incremento de la incidencia de ciertas patologías como metritis, mastitis, meteorismo y neumonías y signos clínicos como tos, abortos y cojeras, así como con lesiones cutáneas.

2.1.4. LESIONES

La infestación por *Hypoderma* spp es responsable de alteraciones locales o generales debidas a la acción patógena de las fases larvarias del parásito, especialmente por el papel inmunológico de las secreciones liberadas y por la acción mecánica e irritativa ejercida durante su migración intraorgánica.

2.1.4.1. Fase de invasión cutánea

La reacción en el punto de entrada es diferente dependiendo del número de infestaciones que haya sufrido el animal; así, en animales primoinfestados, las larvas penetran sin dificultad, ya que la reacción celular es débil, limitándose a una ligera infiltración eosinofílica. No obstante, en casos de reinfestaciones se generan fuertes reacciones edematosas alrededor de la L-1, formándose un exudado seroso que aglutina los pelos alrededor de los puntos de penetración (Hadwen y Fulton, 1924). En ocasiones, sobre todo en animales de piel clara, pueden observarse zonas petequiales próximas a la raíz de los pelos; microscópicamente, se observa un infiltrado de células

inflamatorias, eosinófilos y restos de fibras de colágeno (Nelson y Weintraub, 1972). Asimismo, Simmons (1937) destaca la escasez de neutrófilos en zonas próximas a las larvas. En bovinos muy sensibilizados pueden apreciarse pequeñas zonas de necrosis, irritación, inflamación, costras epidérmicas y erizamiento del pelo. En estos animales, la piel actúa como una verdadera barrera debido a la intensa respuesta celular que en ella se produce y que dificulta o impide la entrada de nuevas larvas. En este sentido, Nelson y Weintraub (1972) comprobaron que al suprimir la reacción cutánea de base celular, mediante la administración de ACTH a bovinos previamente infestados, aumentaba de forma significativa el número de larvas que lograban superar la barrera cutánea.

López *et al.* (2005) estudiaron la respuesta inmune celular que tiene lugar en la piel de ganado primo y reinfestado mediante infección experimental con larvas de *Hypoderma lineatum*. Evidenciaron que en las infecciones secundarias se desarrolla una respuesta celular que lograría destruir a algunas larvas durante la entrada, dando lugar a un cierto grado de resistencia. Así, las biopsias de piel de animales primoinfestados se caracterizaron por una respuesta inflamatoria moderada. Más tarde, Dacal *et al.* (2011) estudiaron la respuesta inflamatoria en el punto de entrada de las larvas 1, evidenciando una distribución desigual de las distintas poblaciones celulares; mientras que los linfocitos T se localizaban tanto en torno a los vasos superficiales como profundos de la dermis y también dispersos en la hipodermis; los linfocitos B se localizaban casi de forma exclusiva en la dermis superficial.

2.1.4.2. Fase de migración y reposo

Durante la migración hacia los lugares de reposo, las larvas se desplazan y aumentan de tamaño, induciendo una reacción inflamatoria aguda que va acompañada de vasodilatación, y dejando a su paso trayectos gelatinosos con abundante infiltrado leucocitario. A ello, se añade la destrucción del tejido conjuntivo que rodea a la larva por acción directa de sus secreciones que son ricas en colagenasa, glicoproteasa y elastasa. Alrededor de las larvas hay una reacción edematosa, hiperémica, con infiltrado eosinofílico y abundantes fibras de colágeno irregulares y parcialmente destruidas. En el exudado que rodea a la L-1 se aprecian bandas de fibrina, algunos glóbulos rojos, linfocitos y eosinófilos; estas larvas vivas normalmente no aparecen encapsuladas por

tejido fibroso. La alteración tisular y la reacción edematosa alrededor de las L-1 se acentúan con el crecimiento de estas (Boulard, 1975).

En su migración, siguiendo los planos aponeuróticos de los músculos de la parte anterior del cuerpo, las L-1 de *H. lineatum* ocasionan, principalmente, lesiones inflamatorias locales en el tejido conjuntivo del mediastino, pleura, pulmones y diafragma. Estas lesiones se caracterizan macroscópicamente por la presencia de focos de edema gelatinoso, amarillento o verdoso y microscópicamente se observa que el tejido edematoso está infiltrado por un trayecto denso de eosinófilos (Pancieri *et al.*, 1993).

En los lugares de reposo de las larvas de *Hypoderma* spp., la reacción del hospedador también difiere según se trate de primoinfestación o reinfestación. En cualquier caso, en estas localizaciones no suele haber mortalidad larvaria ya que, en condiciones normales, la mayoría de las larvas que llegan al esófago o al canal raquidiano se movilizan después hacia el dorso.

En la submucosa esofágica, las larvas de *H. lineatum* originan un edema gelatinoso con focos amarillentos acompañados con frecuencia de hemorragias petequiales alrededor. Mientras que en la primoinfestación las lesiones son de escasa entidad, observándose únicamente un ligero edema y coloración blanquecina de la submucosa, en animales reinfestados la migración de la larva por la submucosa esofágica determina la aparición de un intenso edema gelatinoso de color amarillento, acompañado de trayectos hemorrágicos. Este cuadro se confirma a nivel microscópico, donde se observa una infiltración eosinofílica y macrofágica más acentuada en las proximidades de la larva (Arru *et al.*, 1985). Por otra parte, López *et al.* (1999b) comprobaron que las lesiones en esófagos parasitados iban desde las apenas visibles hasta trayectos fuertemente hemorrágicos. A menudo las larvas estaban rodeadas de un intenso edema gelatinoso de color amarillento que, en ocasiones, afectaba prácticamente a todo el esófago. En algunos esófagos se encontraron formaciones quísticas de consistencia dura, en cuyo interior se hallaron larvas. El examen histológico de la mayor parte de los esófagos mostró un infiltrado inflamatorio perivascular constituido por células plasmáticas y/o macrófagos y polimorfonucleares eosinófilos. Ocasionalmente se apreció un intenso infiltrado eosinofílico alrededor de las larvas, y en otros animales

se observó también miositis, sobre todo en la capa muscular interna del esófago, con atrofia de parcial de las fibras musculares.

Boulard (1975) describió histológicamente tres zonas alrededor de las larvas esofágicas: una capa prelarvaria, que se corresponde con el primer estadio de una reacción inflamatoria y que se manifiesta por alteraciones vásculo-sanguíneas; sin destrucción tisular, pero con una importante vasodilatación e infiltración leucocitaria. En la zona perilarvaria, se distinguen, a su vez, tres partes: en la más externa, el tejido aparece edematoso, no existe destrucción tisular, pero las fibras de colágeno están distendidas y disociadas; este tejido está infiltrado por eosinófilos, numerosos monocitos, neutrófilos y algunos linfocitos; el segundo nivel se caracteriza por la degradación de todas las estructuras fibrosas del tejido y, por último, el plano más cercano a la larva que se corresponde con la última etapa de degradación, se encuentra separado de la cutícula larvaria por una capa fina y amorfa constituida por las secreciones de sus glándulas salivales. Finalmente, se encuentra la zona postlarvaria, que presenta las mismas etapas de destrucción tisular que la anterior, pero se observa una evolución hacia la cicatrización.

Tras la aplicación tardía de un tratamiento precoz a animales infestados con *H. lineatum* aparecen en la submucosa esofágica intensos edemas gelatinosos de color amarillento, que reducen considerablemente la luz esofágica. Existe también inflamación aguda con trayectos congestivos y hemorrágicos, que afectan a la mucosa y a las capas musculares del esófago (Boulard *et al.*, 1991).

En el canal raquidiano de animales infestados por *H. bovis* y más concretamente en la grasa perineural, se observan lesiones edematoso-hemorrágicas más o menos extensas y nódulos de varios milímetros de diámetro de color gris-amarillento, cuya consistencia varía de pastosa a dura. Histológicamente, se observan dos cuadros típicos, uno caracterizado por la presencia de trayectos necrótico-hemorrágicos ricos en fibrina, ampliamente infiltrados de eosinófilos y rodeados por un tejido de granulación intensamente vascularizado, y en el que predomina el componente macrofágico-eosinofílico, y otro con una rápida evolución hacia un tejido granulomatoso, con infiltración de macrófagos, linfocitos, células epiteliales y células gigantes (Arru *et al.*, 1985).

Sergent (1941), a pesar de no haber observado lesiones macroscópicas en la médula espinal de animales parasitados por *H. bovis*, afirma que a veces pueden aparecer hemorragias y coágulos epidurales que la comprimen, sobre todo en la región dorso-lumbar, entre la 5ª vértebra torácica y la 6ª lumbar, y que originan problemas locomotores. Durin y Peres (1953) describen el caso curioso de un novillo en el que se encontraron tres larvas de *H. bovis* que habían seccionado parcialmente la médula a nivel de las vértebras dorsales.

Khan (1971) encontró en el canal raquidiano de bovinos infestados por *H. bovis* y tratados con organofosforados trayectos congestivos y hemorrágicos con infiltración serosanguinolenta que afectaba al tejido adiposo del espacio epidural y a la membrana serosa que limita el canal vertebral. En algunas ocasiones aparecían pequeños coágulos en las áreas hemorrágicas situados cerca o rodeando los orificios intervertebrales. Las larvas aparecían en la grasa epidural, o cerca de las áreas que mostraban congestión o decoloración.

Colwell (1991) sugiere que en la superficie de las larvas 1 de *H. lineatum* hay compuestos que tenderían a reducir las respuestas inflamatorias del hospedador, con el consiguiente retraso en la instauración de la respuesta inmune.

2.1.4.3. Fase subcutánea en el dorso

Tras su permanencia en los lugares de reposo, las L-1 emprenden de nuevo la migración para alcanzar la posición subcutánea en el dorso del hospedador y allí mudar a L-2 y L-3. Después de la primera muda larvaria, se produce la expulsión de todo el contenido acumulado durante la fase de primer estadio, el cual estimula una respuesta inflamatoria crónica no supurativa que tiende a encapsular al segundo y tercer estadio larvario con tejido conjuntivo fibroso (Berkenkamp y Drummond, 1990). Los fibroblastos se muestran muy activos, dando lugar a abundantes fibras de colágeno que aíslan rápidamente a las larvas (Boulard, 1975).

López *et al.* (1999a) analizaron los cambios anatomopatológicos del tejido subcutáneo tras la llegada de las L-1 y antes de la formación de los nódulos larvarios. Macroscópicamente, en la cara interna de la piel, se observaron quistes de diferente

tamaño que en ningún caso sobrepasaban los 1,5 cm de diámetro; así como los orificios practicados en la piel por las larvas 2. Microscópicamente, en el tejido subcutáneo se evidenciaron trayectos longitudinales con restos de tejido necrosado acompañados de reacción inflamatoria con infiltrado de linfocitos, células plasmáticas y polimorfonucleares eosinófilos. En una de las muestras observaron una reacción inflamatoria granulomatosa, con abundantes macrófagos y células epitelioides, indicativa de la formación del nódulo larvario. También encontraron zonas de abscesificación de las áreas de necrosis de los trayectos larvarios, en cuya luz había restos celulares y abundante infiltrado de polimorfonucleares neutrófilos.

Este quiste, que corrientemente se denomina “barro”, es similar a un forúnculo y rodea a la larva. En torno a ella hay un contenido sanguinolento y purulento con restos de tejidos que crece con rapidez. Así, Marcato (1990) describe macroscópicamente estos nódulos como duros, elevados y circunscritos, cuyo tamaño oscila entre 1 y 5 cm de diámetro. Histológicamente, los nódulos más recientes, aún no perforados, tienen una cavidad interna con tejido de granulación infiltrado por granulocitos y alrededor hay también una capa fibrosa.

Las lesiones nodulares antiguas, ya perforadas, tienen un orificio rodeado de tejido epitelial pavimentoso-estratificado que se extiende internamente hasta el fondo de la cavidad; debajo se ha formado tejido conjuntivo fibroso con granulocitos y en él también pueden hallarse focos hemorrágicos (Marcato, 1990). La abertura externa, inicialmente tiene 1-2 mm pero más tarde llega a 5-6 mm. Inmediatamente después de la salida de la L-3, se cierra el orificio con tejido granuloso cicatricial aunque, a veces, los restos del parásito retrasan su cicatrización. Ocasionalmente, en los nódulos se produce calcificación, lo que hace que sean más persistentes en el dorso del animal.

2.1.5. RESPUESTA INMUNE EN LA INFESTACIÓN POR *Hypoderma* spp.

2.1.5.1. Hipoderminas y su carácter inmunomodulador

Para realizar la migración intraorgánica, las larvas 1 de *Hypoderma* spp. se valen de la secreción de compuestos enzimáticos que lisan el tejido conjuntivo del hospedador y que más tarde son reabsorbidos, quedando almacenados en el intestino de la larva. Estas enzimas metabólicas son sintetizadas en las glándulas salivales durante la fase

migratoria, es decir, desde que emergen de los huevos hasta que mudan a L-2 en el dorso del hospedador. Según Boulard (1979) no parece existir ninguna semejanza antigénica entre las larvas 1 y las de segundo y tercer estadio.

En las últimas décadas se han llevado a cabo numerosas investigaciones acerca del poder patógeno, antigénico e inmunitario de estas secreciones. Su obtención resulta fácil; a partir de un homogeneizado de L-1 de *H. lineatum*, denominado extracto total o somático a pesar de que, en opinión de Pruett y Barrett (1984), las proteínas solubles obtenidas de esta forma corresponden sobre todo a secreciones enzimáticas contenidas en el intestino larvario y no a antígenos procedentes del tegumento o de tejidos larvarios. Martínez-Moreno (1992) obtuvo antígeno de excreción-secreción incubando las larvas en un medio de cultivo RPMI-1640. Por su parte, Colwell (2011) empleó extractos de tejidos de larvas 3 (fracciones solubles, hemocitos y hemolinfa) para inducir una respuesta inmunitaria, obteniendo con ellos, buenos resultados.

La purificación por cromatografía de intercambio iónico del extracto total larvario ha puesto de manifiesto la existencia de tres proteínas principales, denominadas hipoderminas A, B y C. Estas enzimas, segregadas por las larvas durante su migración, pertenecen al grupo de las serin proteasas, enzimas proteolíticas pertenecientes a la familia de las tripsinas (Boulard, 1970; Tong *et al.*, 1981; Lecroisey *et al.*, 1983).

Pruett y Barrett (1984) fraccionaron las proteínas presentes en un extracto crudo de *H. lineatum* mediante cromatografía de intercambio iónico, utilizando DEAE-A50 como intercambiador aniónico y eluyendo con tampón Tris-HCl 0,001M, pH 7,5 seguido por un gradiente de NaCl de 0 a 1M, obteniendo 7 picos principales que posteriormente fueron identificados mediante PAGE y SDS-PAGE. Del mismo modo, Morrondo (1998) al estudiar mediante electroforesis (SDS-PAGE) el extracto total obtenido a partir de larvas 1 de *H. lineatum*, obtuvo tres fracciones diferentes que, posteriormente, identificó como hipoderminas A, B y C; en este caso, la HyB con un peso molecular de 27,2 kDa, fue la que emigró más rápidamente.

Lecroisey *et al.* (1987) describieron la secuencia completa de aminoácidos de la hipodermina C. Estos mismos autores junto con Tong *et al.* (1981) ya habían determinado las secuencias N-terminales de las hipoderminas A y B.

Schwinghammer *et al.* (1988), al purificar mediante cromatografía de intercambio iónico las distintas fracciones que componen el extracto total larvario de *H. lineatum*, hallaron cuatro picos que se correspondían con las hipoderminas A, B y C; además, obtuvieron una fracción correspondiente al segundo pico de la separación (P2), cuya naturaleza todavía se desconoce. Al comparar las propiedades bioquímicas e inmunoquímicas de esta fracción con las de las hipoderminas verificaron que su actividad proteasa estaba más relacionada con la de la hipodermina B que con la de la A. Por otra parte, la existencia de reacciones inmunoquímicas cruzadas con la hipodermina B sugiere que existen semejanzas entre la hipodermina B y la denominada fracción P2. Del mismo modo, Moiré *et al.* (1994), al realizar la secuenciación de las principales proteínas larvarias, detectaron la presencia de una proteína muy relacionada con la hipodermina B (sus secuencias de ADN coinciden en un 95%) que podría representar una variante isomórfica de esa enzima.

Pruett *et al.* (1988) obtuvieron para las tres fracciones pesos moleculares que difieren a los citados anteriormente, siendo 31,6 kDa, 25,1 kDa y 28,5 kDa, respectivamente. En cualquier caso, el peso molecular de las tres proteasas es bastante similar, lo que determina que al hacerlas migrar electroforéticamente bajo condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE), se obtengan tres bandas principales próximas entre sí, correspondiendo la banda que migra más rápidamente a la menos pesada, es decir, a la hipodermina B, seguida de la C y de la A. No obstante, a pesar de las semejanzas, estas fracciones poseen una secuencia de aminoácidos que difiere en el contenido de residuos cargados, lo que hace que estas tres enzimas posean una movilidad electroforética diferente en condiciones no desnaturalizantes (PAGE). Pruett y Barrett (1984), mediante electroforesis en geles de poliacrilamida y en condiciones no desnaturalizantes, obtuvieron 14 bandas simples, siendo la hipodermina C la que emigraba más rápidamente, seguida de la B y de la A. Esta diferencia de carga facilita su separación mediante cromatografía de intercambio iónico, siendo actualmente el método de elección para la purificación inicial del extracto larvario de *H. lineatum* (Tong *et al.*, 1981; Lecroisey *et al.*, 1983; Pruett y Barrett, 1984; Pruett *et al.*, 1988; Panadero *et al.*, 2009).

Las hipoderminas resisten bien la autodigestión, incluso en condiciones de pH óptimas (Lecroisey *et al.*, 1983) y permanecen intactas durante los 8 meses que dura la migración larvaria intraorgánica en el hospedador. En condiciones desnaturalizantes, la

hipodermis B pierde antigenicidad, mientras que la A y la C, incluso en estas condiciones, conservan toda su capacidad antigénica (Pruett *et al.*, 1988).

Las hipodermis A y B guardan estrecha relación compartiendo uno o varios epitopos; por el contrario, no comparten epitopos o determinantes antigénicos con la hipodermis C (Lecroisey *et al.*, 1983; Pruett *et al.*, 1988). Posteriormente, Moiré *et al.* (1994), al secuenciar las principales proteínas larvarias, observaron que las hipodermis A y B poseen un 74% de similitud; mientras que la hipodermis C sólo tiene un 60% de similitud con la HyA y con la HyB.

En cuanto a la capacidad antigénica e inmunógena de las hipodermis, Pruett *et al.* (1988), mediante “western blotting”, estudiaron la cinética de anticuerpos en animales inmunizados con distintas fracciones proteicas purificadas a partir del extracto total obtenido de L-1 de *H. lineatum*. Concluyeron que la hipodermis C era la más inmunógena, puesto que a los dos meses p.i. se detectaban anticuerpos contra esta fracción, mientras que con la hipodermis A se observaban un mes más tarde, por lo que consideraron a estas dos hipodermis como los compuestos más inmunógenos del extracto larvario; no obstante, el hecho de que ambas se encuentren en altas concentraciones al principio de la infestación, sugiere que la aparición temprana de anticuerpos podría estar provocada por estos antígenos. Diversos autores (Boulard, 1970; Boulard y Weintraub, 1973; Robertson, 1980; Gingrich, 1982; Pruett y Barrett, 1985; Boulard, 1985; Chauvin, 1987; Prieto *et al.*, 1990; Chabaudie y Boulard, 1993; Morrono, 1998) han comprobado que la hipodermis C induce una rápida respuesta inmune, que se detecta dos meses después de la infestación; por lo tanto, desde 1970 la hipodermis C constituye el antígeno de elección para el inmunodiagnóstico de la hipodermosis bovina.

Fisher *et al.* (1991) comprobaron que la HyA induce una respuesta blastogénica linfocítica como resultado de la vacunación y/o infestación; sin embargo, no observaron correlación entre la magnitud de la respuesta antígeno-específica, la linfoproliferación periférica y la mortalidad larvaria.

Chabaudie y Boulard (1992) sugirieron que la HyA es la proteína larvaria con mayor actividad inhibidora sobre el sistema inmune del hospedador. De acuerdo con Nicolas-Gaulard *et al.* (1995) esta inmunosupresión provocada por la HyA puede ser

debida a un aumento del nivel de prostaglandina E2 (PGE2), molécula con fuerte capacidad antiproliferativa, secretada por monocitos y macrófagos. Además, Tarleton (1988) comprobaron que la PGE2 inhibía la secreción de IL-2 e IFN- γ por las células mononucleares durante la infección experimental con protozoos parásitos como *Leishmania* spp. o *Trypanosoma cruzi*. Chen *et al.* (2015) observaron estos mismos efectos con HyA recombinante en células de cobayas.

Los resultados obtenidos por Pruett (1993) demuestran que la hipodermina A es capaz de desdoblar la inmunoglobulina G *in vitro*, dando lugar a un fragmento (fab)², mientras que los fragmentos de la cadena larga asociados al desdoblamiento de la fracción Fc permanecen inalterados. La hipodermina A no sólo degrada las IgG bovinas, sino también las de otras especies, así como otras proteínas del ganado vacuno; además puede inactivar macrófagos y otras células implicadas en el desarrollo de la respuesta inmune. La destrucción de la actividad biológica de las IgG bovinas sugiere la puesta en acción de un mecanismo de evasión que contribuye a la supervivencia de las L-1.

Godon (1994) observó que la HyA e HyB inhiben la actividad quimiotáctica de los neutrófilos “*in vitro*” y Chabaudie (1987) comprobó que también se inhibe “*in vivo*”, mientras que Barquet *et al.* (1992) afirmaron que modulan la expresión de las moléculas implicadas en la migración y reclutamiento de los neutrófilos.

Moiré *et al.* (1998) observaron que la HyA interfería en la unión de algunos anticuerpos monoclonales (CD2, CD5, CD4, CD8, CD18) a la superficie de linfocitos y monocitos, lo que podría deberse a su acción enzimática, degradando algunos epitopos de estas moléculas aunque no la molécula completa. En un estudio posterior, comprobaron que determinados epítomos de la membrana de los linfocitos, necesarios para la activación y proliferación, eran degradados por la HyA (Moiré *et al.*, 1998).

Chabaudie y Boulard (1993) observaron que la inyección de la hipodermina C a bovinos no infestados e infestados previamente no modificaba significativamente la respuesta linfocitaria a diferentes mitógenos, así mismo, tampoco influía negativamente en las respuestas celular y humoral específicas en los bovinos infestados.

Khaznadji *et al.* (2003) compararon la HyA natural y recombinante observando que la HyA natural reduce en un 70% los linfocitos tipo CD4⁺ y en un 90% los CD5⁺, mientras que la HyA recombinante los reduce en un 60% y 85%, respectivamente.

En estudios posteriores, se compararon mediante ELISA e inmunoblotting los resultados obtenidos con la hipodermina C recombinante y el antígeno natural de *Hypoderma* (Carballo, 1999; Panadero *et al.*, 2000). La sensibilidad del ELISA con el antígeno recombinante fue del 95,8% y la especificidad del 95,7%; mientras que con el antígeno natural obtuvieron un 98,2% para ambos parámetros. Con el inmunoblotting, el comportamiento de ambos antígenos fue similar, por lo que concluyeron que el antígeno recombinante obtenido era válido para el inmunodiagnóstico de la hipodermosis bovina en condiciones de campo y que constituía una buena alternativa frente al uso de antígenos parasitarios, en especial en aquellos países en los que sea difícil obtener larvas 1 de *Hypoderma* spp.

En lo que respecta al empleo de la hipodermina C, Panadero *et al.* (2007b) evaluaron un ELISA de captura del antígeno para el diagnóstico precoz de *H. lineatum* en ganado mantenido en condiciones de campo, concluyendo que, si bien esta técnica permite realizar un seguimiento de la migración larvaria, no es una buena herramienta para el diagnóstico temprano, ya que los niveles de hipodermina C permanecen en niveles bajos hasta que las larvas alcanzan el esófago.

Colwell *et al.* (2008) estudiaron la evolución de la hipodermina C circulante y la producción de anticuerpos en animales infestados artificialmente con *H. lineatum*, observando que, si bien no existen diferencias significativas entre animales primoinfestados y reinfestados, en estos últimos se observa una mayor destrucción larvaria.

Respecto a los estudios realizados en el campo de la hipodermosis bovina, son numerosos los investigadores que han dedicado sus esfuerzos a conseguir antígenos recombinantes para el diagnóstico y obtención de vacunas frente a esta miasis. Con la tecnología recombinante se han conseguido compuestos proteicos de calidad antigénica, comparable a los purificados a partir del parásito y en suficiente cantidad como para llevar a cabo análisis inmunológicos a gran escala.

Temeyer y Pruett (1990) llevaron a cabo el aislamiento del ARN mensajero a partir de larvas 1 de *H. lineatum*, permitiendo de este modo la síntesis del ADN complementario para el clonado génico de las proteínas larvarias. Posteriormente, Moiré

et al. (1994) efectuaron la secuenciación y clonado del ADNc que codifica a las tres hipoderminas larvarias.

Webster (1998) consiguió producir hipodermina C recombinante utilizando un fago gt11 expresado en *Escherichia coli*, si bien no fue capaz de aislarla de los extractos bacterianos. Lo consiguieron Casais *et al.* (1998), quienes expresaron el ADNc de la hipodermina C madura en *E. coli* como proteína de fusión con la glutathion S-transferasa (GST) y la purificaron mediante cromatografía de afinidad, utilizando factor X_a para romper la proteína de fusión. Esta proteína recombinante mostró actividad enzimática en geles de poliacrilamida y en azocoll; además, mostró una inusual estabilidad a altas temperaturas manteniendo su actividad intacta después de dos horas de incubación a 70° C. También emplearon esta hipodermina C recombinante para la puesta a punto de un test ELISA, obteniendo una especificidad del 98,2% y una sensibilidad del 85%. Esta baja sensibilidad se atribuye al escaso número de sueros positivos empleados y no a una falta de calidad del antígeno recombinante. Estos autores obtuvieron, a partir de un litro de cultivo de *E. coli*, suficiente hipodermina C como para procesar por duplicado más de 3000 sueros de bovinos.

Respecto a la especificidad y reacciones cruzadas entre los antígenos de *H. bovis* e *H. lineatum*, Petithory y Boulard (1979) demostraron la existencia de reacciones cruzadas poniendo en evidencia la similitud antigénica entre ambas especies; no obstante, en algunas ocasiones sólo se obtuvieron resultados positivos con el antígeno de *H. bovis*. Asimismo, Robertson (1980) confirmó la existencia de reacciones cruzadas entre las dos especies de *Hypoderma* al detectar, mediante hemoaglutinación pasiva, anticuerpos en animales infestados experimentalmente con *H. bovis*, utilizando como antígeno extractos larvarios de *H. lineatum*. Igualmente, Khan (1981), mediante un test de reacción intradérmica, observó reacciones cruzadas entre las dos especies de *Hypoderma*, con un antígeno a base de extracto larvario de L-1 de *H. lineatum*. Posteriormente, Sinclair y Wassall (1983) apreciaron reacciones cruzadas entre *H. bovis* e *H. lineatum*, pero no con *Fasciola hepatica* ni con *Ostertagia ostertagi*.

La existencia de resistencia cruzada entre las hipoderminas de *H. lineatum* e *H. bovis*, especialmente con la HyC, llevó a pensar en la posibilidad de un producto vacunal polivalente. Pruett *et al.* (1988) comprobaron reactividad cruzada considerable

entre ambas especies de *Hypoderma*, demostrando la existencia de epitopos compartidos, asociados en su mayor parte con la hipodermina C y A.

El descubrimiento de que los antígenos derivados de las L-1 de *H. lineatum* estimulan la resistencia a la infestación ha promovido su uso para tratar de desarrollar vacunas que protejan artificialmente al ganado frente a la infestación por *Hypoderma* spp. Así, Magat y Boulard (1970) revelaron la posibilidad de inducir respuesta inmunitaria utilizando como antígeno la fracción colagenasa obtenida de L-1 de *H. lineatum* y parcialmente purificada. Aunque esta inmunidad se mostró incompleta, si supuso la disminución del número de nódulos larvarios en infestaciones por *H. bovis* e *H. lineatum*.

Boulard y Lecroisey (1982) ensayaron un método rápido y simple para la producción de anticuerpos específicos en conejos inmunizándolos con tiras de poliacrilamida con pequeñas concentraciones de proteína. La desnaturalización de la proteína mediante SDS no modificó su antigenicidad y por otra parte los geles de poliacrilamida químicamente son inertes y no indujeron una reacción inmune en el conejo.

Baron y Weintraub (1986) inmunizaron un grupo de vacas con un extracto de L-1 de *H. lineatum* (antígeno somático) y otro grupo con el sobrenadante procedente de un cultivo de las mismas (antígeno de excreción-secreción). Ambos tratamientos redujeron un 50% los barros respecto a los testigos no inmunizados; la supervivencia de las larvas de *H. lineatum* se redujo significativamente con el antígeno somático, mientras que la de *H. bovis* se vio afectada con ambos extractos.

Pruett *et al.* (1987), en ganado bovino primoinfectado y vacunado con hipodermina A, consiguieron una mortalidad larvaria del 89,9%, frente al 35% en los primoinfectados no vacunados. Esta mortalidad superó incluso a la obtenida en animales sometidos a varias infestaciones (60,9%). Esta resistencia se mantenía durante más de un año después de la vacunación.

La hipodermina A se considera la más inmunógena y en este sentido, Pruett *et al.* (1989) demostraron que la disminución del número de larvas viables era mayor si se inmunizaba con hipodermina A purificada que si se hacía con una mezcla de hipoderminas B y C. Chabaudie *et al.* (1991) ensayaron distintos protocolos de

vacunación, empleando hipodermina A sola o combinada con el adyuvante incompleto de Freund; sin embargo, incluso con este protocolo de vacunación, se inducía una protección muy incompleta ante la infestación natural. Baron y Colwell (1991) observaron que animales inmunizados con una combinación de hipoderminas A, B y C a la que se añadía un inmunoestimulante, el MPL, desarrollaban una respuesta celular antígeno-específica y humoral más marcada que la de los testigos infestados, y que se relacionaba con el grado de protección de esos animales.

Colwell (2011) consiguió inmunizar experimentalmente terneros frente a *H. lineatum* empleando extractos de tejidos de larvas 3 (fracciones solubles, hemocitos y hemolinfa). Los animales tratados presentaron una mayor mortalidad larvaria en relación al grupo control, desarrollando una respuesta de tipo humoral frente al parásito. Además, no se desarrollaron moscas viables a partir de los nódulos de estos animales. Es por eso que las nuevas tendencias de investigación en el ámbito de la vacunación frente a miasis se centran en el empleo de antígenos nativos aún no caracterizados (Sandeman *et al.*, 2014).

Debido a sus propiedades inmunosupresoras, las hipoderminas A y C se han empleado en estudios de rechazo de trasplantes con resultados bastante prometedores (Régimbeau *et al.*, 2001; Malassagne *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2014; Hu *et al.*, 2014; Chen *et al.*, 2015). Así, Régimbeau *et al.* (2001) comprobaron que la supervivencia *ex vivo* de corazones de cobayas era mayor al infundirlos con suero de ratas suplementados con HyA con respecto a sueros control, comprobando que esta proteína retrasa la reacción hiperaguda de rechazo debido a su acción inhibidora del sistema de complemento. Estos resultados coinciden con los observados por Malassagne *et al.* (2003). Estos autores comprobaron *in vitro* que los sueros de ratas suplementados con HyA presentaban una actividad lítica significativamente inferior a los sueros control, sobre cultivos de células endoteliales de cobayas. De la misma manera, los corazones de cobayas trasplantadas en ratas sobrevivían durante más tiempo en aquellos animales que habían sido tratados previamente con HyA, evidenciando una vez más el papel fundamental de esta hipodermina en la prevención de la reacción de hipersensibilidad en xenotrasplantes.

Recientemente, Chen *et al.* (2014) sintetizaron HyA recombinante y estudiaron sus efectos sobre la fracción C3 del sistema de complemento de cobayas mediante

ensayos de coimmunoprecipitación. Estos autores obtuvieron una línea de células que expresaban la HyA, más resistentes a la lisis por el C3 que las células control. Igualmente, comprobaron que la HyA degradaba las fracciones C6 y C5b-9 del sistema de complemento de los cobayos. Ese mismo año, Hu *et al.* (2014) realizaron un estudio muy similar, esta vez empleando la HyC recombinante, que demostró inhibir “in vitro” el sistema de complemento. Chen *et al.* (2015) estudiaron en profundidad el mecanismo a través del cual la HyA es capaz de inhibir la respuesta inmunitaria, observando que esta hipodermina induce la expresión de la PGE2, lo que se traduce a su vez, en una disminución de la expresión del IFN- γ y la IL-2 y en un incremento de la IL-10, sugiriendo el empleo de esta proteína en alotrasplantes.

2.1.5.2. Respuesta innata

Weintraub *et al.* (1961) comprobaron la existencia de resistencia innata en terneros infestados por *Hypoderma*. Esta resistencia se expresa fundamentalmente en la piel, y está asociada al aporte de vitamina A, produciendo mortalidades del 65-75% de las larvas en la fase de la penetración. A medida que los terneros crecen, la resistencia innata va disminuyendo y va siendo reemplazada por la resistencia adquirida, originada a partir del primer contacto con el parásito (Gingrich, 1980).

Boulard y Bencharif (1984) pusieron en evidencia la actividad inhibidora de las hipodermis A y B sobre el complemento hemolítico bovino, lo que permite al parásito eludir la reacción temprana de defensa del hospedador. Debido a su importancia en el desarrollo de la respuesta inflamatoria, esta actividad es más intensa en los animales jóvenes que en los adultos infestados con anterioridad. Posteriormente, Boulard (1989) y Baron (1987) precisaron su mecanismo de acción degradando el factor C3 que controla el inicio de la respuesta inflamatoria y de la reacción inmune en ganado no infestado previamente, lo que contribuye a inhibir o atenuar estas reacciones y favorecer la supervivencia de las larvas en el hospedador. Consecuentemente, la supervivencia de las larvas en terneros supera a la de los animales de más edad. Baron (1990) señala que la hipodermina A es la más eficiente en la degradación del C3 bovino, ya que es capaz de degradar las cadenas α y β .

2.1.5.3. Respuesta adquirida

La resistencia adquirida comienza a desarrollarse a partir de la primera infestación del hospedador (Gingrich, 1980), pero no alcanza su máxima expresión hasta la tercera o cuarta infestación, apreciándose un descenso, en algunos casos muy notable, en el número de nódulos dorsales, al tiempo que baja el porcentaje de la viabilidad en relación con las anteriores parasitaciones (Gingrich 1982; Pruett y Barrett, 1985; Baron y Weintraub, 1987).

Por lo tanto, la respuesta del hospedador será distinta en función de que se trate de primoinfestación o reinfestación. Desde hace tiempo se sabe que animales mayores, que han sufrido otras infestaciones por *Hypoderma*, presentan ligeras tumefacciones y pequeños exudados en el lugar de penetración de las larvas, a la vez que muestran un número sensiblemente inferior de barro en el dorso en comparación con los más jóvenes.

Weintraub *et al.* (1961) demostraron que el número de larvas llegadas al dorso era inversamente proporcional al número de larvas infestantes, es decir, que a mayor número de huevos depositados en los pelos, menor número proporcional de barro y por lo tanto una mayor mortalidad larvaria, como consecuencia de la activación de la respuesta inmune.

Entre los factores más influyentes en la resistencia están la intensidad de parasitación, el número de reinfestaciones previas y las pautas de desparasitación. Se ha observado que animales con una importante infestación en un año, al siguiente fueron menos receptivos. Por el contrario, los infestados débilmente o tratados precozmente con un insecticida, tuvieron infestaciones más intensas la temporada siguiente (Evstaf'ev, 1980).

2.1.5.3.1. Respuesta inmunitaria celular

Gingrich (1982) sugirió la participación de respuesta de base celular en el desarrollo de la resistencia adquirida frente a la hipodermosis, al observar que los animales más resistentes a la infestación tenían, un mes después de la infestación,

actividad MIF (Macrophage Migration Inhibitory Factor) más elevada que los menos resistentes, al tiempo que reaccionaban más activamente a los antígenos de las larvas que penetraban en la piel.

Otros autores (Colwell, 1985 y Baron y Weintraub, 1987) observaron correlación entre la intensidad de la respuesta inmune celular y el estado de protección en animales resistentes previamente infestados. De este modo, Baron y Weintraub (1987) detectaron *in vitro* una respuesta linfoproliferativa antígeno-específica que variaba con las fases de la infestación y que se correlacionaba positivamente con la resistencia del hospedador, lo que sugería que la resistencia adquirida era de base celular con participación de linfocitos B y T. Así, en animales reinfestados, la respuesta celular es intensa durante los dos meses posteriores a la infestación, coincidiendo con la migración de las L-1 hacia los lugares de reposo, pero se mantiene relativamente baja con la permanencia de las L-1 en estas localizaciones, para intensificarse de nuevo cuando se reanuda la migración hacia el dorso y se forman los nódulos larvarios. Sin embargo, en animales primoinfestados esta reacción inmunitaria de base celular es más tardía.

Doby *et al.* (1987) observaron en casos de hipodermosis humana que la hipereosinofilia se mantiene mientras las larvas poseen una actividad secretora-excretora en los tejidos profundos, pero el número de eosinófilos vuelve a la normalidad cuando cesa esa actividad, es decir, cuando las larvas son neutralizadas por la respuesta serológica y tisular del organismo.

Nelson y Weintraub (1972) y Colwell (1985) encontraron una relación inversa entre la supervivencia larvaria en animales previamente infestados y los valores de eosinofilia. Así, durante la invasión de la piel, la intensidad de la respuesta celular eosinofílica aumenta si ha habido exposiciones anteriores, observándose en el trayecto de entrada en animales reinfestados un abundante exudado eosinofílico próximo al extremo posterior de la larva. También se observa rápida elevación del nivel de eosinófilos en sangre que alcanza su máximo entre los 7-20 días posteriores a la entrada de la larva (Nelson y Weintraub, 1972; Nelson, 1987 y Colwell, 1985); estos niveles se mantienen relativamente altos durante la fase migratoria (Colwell, 1985), y se incrementan de nuevo coincidiendo con la aparición de las larvas en el dorso.

Colwell (1985) demostró correlación entre el nivel de eosinófilos circulantes, en animales previamente infestados y el grado de resistencia. Así mismo, Panadero (1996), al relacionar los niveles de anticuerpos con el número de eosinófilos circulantes durante el ciclo de *Hypoderma lineatum*, comprobó que los niveles de anticuerpos se relacionaban con el ciclo, y precedían a la aparición del número máximo de barros, en el mes de marzo, para posteriormente descender rápidamente. La evolución de los eosinófilos circulantes fue paralela a la respuesta humoral, con un incremento durante la migración intraorgánica, para llegar al nivel máximo en el mes de diciembre, lo cual coincidía con el inicio de la llegada de las larvas al dorso del animal.

La proliferación de linfocitos (Baron y Weintraub, 1987) y la tasa de neutrófilos (Romaniuk, 1974) siguen curvas paralelas, incrementándose al inicio de la migración de las larvas, para elevarse de nuevo durante la migración al dorso.

En la fase de penetración larvaria, López *et al.* (2005) estudiaron la respuesta celular en animales primoinfestados y reinfestados, detectando a las 48 h.p.i. una infiltración perivascular formada por linfocitos T CD3+, especialmente intensa en animales previamente infestados, con un aumento significativo respecto a los no infestados. Igualmente, Dacal *et al.* (2011) observaron que mientras que los perfiles de de CD3+ y CD8+ eran similares en los distintos grupos de animales, existían diferencias en el patrón de los linfocitos de CD4+, con aumento significativo a las 96, 6 y 48 hpi en animales primoinfestados, reinfestados por segunda vez y tercera vez, respectivamente. Asimismo, evidenciaron un predominio de CD4+ durante todo el proceso de penetración larvaria.

En lo que respecta a la respuesta celular sistémica, Vázquez *et al.* (2012) apenas observaron variaciones en los niveles de linfocitos CD4+ y CD8+ durante el ciclo endógeno del parásito en animales primoinfestados. Panadero *et al.* (2013), sin embargo, señalaron un aumento de los niveles de CD4+ en animales reinfestados en la fase de aparición de nódulos larvarios en el dorso.

2.1.5.3.2. Respuesta inmunitaria humoral

La acción de las L-1 provoca una respuesta humoral dirigida hacia las hipoderminas sintetizadas por sus glándulas salivales (Boulard *et al.*, 1970).

Boulard y Weintraub (1973) estudiaron mediante hemoaglutinación pasiva la respuesta inmunológica en conejos infestados experimentalmente con L-1 de *H. bovis* e *H. lineatum*, poniendo en evidencia un aumento en los niveles de anticuerpos durante los 2 primeros meses postinfestación, con niveles máximos que se mantuvieron hasta el día 200 p.i.; observaron también que la capacidad de estimulación de la síntesis de anticuerpos por parte de los productos metabólicos de las larvas era mayor que la de los antígenos somáticos. Los primeros anticuerpos detectados estaban siempre dirigidos contra la fracción colagenasa de la larva.

Durante la migración larvaria se aprecian importantes variaciones individuales en la respuesta humoral del hospedador, atribuibles a la muerte esporádica y más o menos lenta de las larvas; no obstante, en general la curva es ascendente y se repite en cada ciclo del parásito (Boulard, 1975).

La respuesta humoral del hospedador es diferente según se trate de una primoinfestación o de una reinfestación. En una primoinfestación la reacción es más lenta; de modo que los anticuerpos circulantes empiezan a detectarse a los 60-90 días postinfestación (Robertson, 1980; Gingrich, 1982; Baron y Weintraub, 1987), lo que sugiere que la resistencia adquirida se desarrolla lentamente, o que es objeto de una inmunodepresión. Pruett y Barrett (1985) y Pruett *et al.* (1987) detectaron en el suero IgG dirigidas contra los antígenos de las L-1 de *H. lineatum* a las 4-6 semanas postinfestación en ganado no infestado previamente.

Independientemente de la edad, los animales primoinfestados poseen una cinética de anticuerpos similar, aunque el título máximo de anticuerpos en los más jóvenes es significativamente más elevado que en los mayores (Robertson, 1980). Panadero (1996) y Morrondo (1998) comprobaron la ausencia de diferencias significativas respecto a la edad de los animales, mientras que el número de infestaciones previas de los animales sí influyó de forma considerable sobre la intensidad de la respuesta inmune.

En el caso de reinfestaciones, Colwell y Baron (1990) afirmaron que la respuesta anticuerpo comienza a detectarse a los 30 días postinfestación y se incrementa durante 3-4 semanas, coincidiendo con la migración de la larvas hacia el esófago y el canal espinal; durante su permanencia en las zonas de reposo invernal, los niveles de anticuerpos descienden y permanecen relativamente bajos hasta que las larvas comienzan su migración

hacia el dorso (25-28 semanas postinfestación). Los anticuerpos alcanzan el nivel máximo 1-2 semanas antes de la aparición del mayor número más elevado de nódulos en el dorso (37-43 sem. p.i.), debido a la liberación masiva de enzimas que lleva consigo la muda larvaria (Boulard, 1969); esta reacción es, sin embargo, de corta duración, se atenúa rápidamente y tiende a anularse una vez que todas las larvas han pasado al segundo y tercer estadio. En opinión de Pruett *et al.* (1987), este descenso del título de anticuerpos es especialmente importante en animales que sufren su primera infestación.

En humanos, Doby *et al.* (1982) observaron que a diferencia de lo que ocurre en aquellas helmintosis en las que el agente parasitario está en contacto temporal o permanente con los tejidos o la sangre del hospedador y provoca una elevación significativa de la tasa de IgE con respecto de los individuos sanos, en la hipodermosis este aumento no es tan importante, no existiendo una relación entre la aparición de manifestaciones clínicas y el periodo de migración con los niveles de IgE.

Sinclair *et al.* (1984) al estudiar la persistencia de los anticuerpos tras la infección con *H. bovis*, observaron que en ganado primoinfectado los anticuerpos comienzan a decrecer tras la aparición de las larvas en el dorso, siendo negativos 14 semanas después del cese de la infección; por ello la presencia de anticuerpos a finales del otoño e invierno supone una nueva infestación. Además, estos autores no encontraron una correlación entre el grado de infección y la persistencia de los anticuerpos. Colwell y Baron (1990) apuntaron que solo en los animales con infestaciones leves (1-4 barro) cesa la producción de anticuerpos cuando se desprenden las últimas larvas, mientras que aquellos con cargas parasitarias superiores tienden a mostrar anticuerpos persistentes; incluso algunos animales pueden permanecer positivos durante más de un año.

Por otra parte, Pruett y Temeyer (1989) demostraron la existencia de anticuerpos calostrales anti-*Hypoderma* en vacas infestadas; los niveles son máximos el día del parto para disminuir rápidamente, de modo que a los 14 días representan solo el 4,2% con respecto a los existentes en el parto. La persistencia de los anticuerpos calostrales, así como de los séricos de vacas infestadas, es de aproximadamente 3-4 meses. A pesar de que los anticuerpos calostrales manifiestan actividad frente a todas las proteínas larvarias, la mortalidad larvaria en estos animales es muy baja, lo que indica que no poseen un claro efecto protector. La presencia de estos anticuerpos maternos puede retrasar la respuesta humoral y celular de los terneros ante una primoinfestación, de modo que no se observan

anticuerpos hasta dos meses postinfestación. Martínez-Gómez *et al.* (1991) también detectaron la presencia de anticuerpos en terneros que no habían tenido ocasión de infestarse, sugiriendo la transmisión de anticuerpos anti-*Hypoderma* vía calostrado.

Respecto a la respuesta inmunitaria después del tratamiento precoz frente a la hipodermosis, se ha demostrado que la destrucción de las larvas de *Hypoderma* conlleva la liberación del contenido enzimático de su intestino medio, lo que provoca una reacción inmunitaria más o menos rápida e intensa dependiendo del tipo de insecticida, de la dosis empleada y de la vía de administración (Panadero *et al.*, 1997).

En este sentido, Barral (2000) y Panadero *et al.* (2001) estudiaron el perfil de IgM e IgG así como las subclases IgG1 e IgG2 en bovinos infestados y tratados con ivermectina subcutánea. Así, en los animales control los perfiles de IgG permanecieron constantes durante la infestación con un incremento durante la migración larvaria. En el caso de la subclase IgG2 este incremento se retrasó dos semanas, coincidiendo con la aparición de los nódulos larvarios en el dorso, lo que se correspondía con el mes de diciembre. Los niveles descendieron significativamente cuando las larvas abandonaron el hospedador y al acercarse a los meses de mayo-junio, los niveles de estos anticuerpos volvieron a incrementarse, probablemente coincidiendo con una nueva infestación. En cuanto a la IgM, los niveles apenas oscilaron a lo largo del ciclo del parásito. En los animales tratados con ivermectina, la IgG y sus subclases mostraron un incremento significativo cuatro semanas después del tratamiento para posteriormente descender significativamente hasta las 12 semanas. En este mismo grupo de animales, el nivel de anticuerpos también aumentó al acercarse al final del estudio, coincidiendo con un ciclo nuevo del parásito.

A nivel local, Dacal *et al.* (2011) observaron en la fase de penetración larvaria, que el número de linfocitos B era superior en los animales reinfestados con respecto a los primoinfestados, especialmente evidente a las 12 hpi.

En lo referente a los perfiles séricos de inmunoglobulinas, se ha comprobado que los niveles de IgG aumentan de forma significativa al finalizar el ciclo endógeno del parásito, tanto en animales primoinfestados como reinfestados naturalmente (Vázquez *et al.*, 2012; Panadero *et al.*, 2013). Mientras que las IgG2 se elevan cuando las larvas alcanzan las zonas de reposo invernal, las IgG1 incrementan en el momento que inician su migración hacia el dorso. Ambas subclases decrecen significativamente cuando las

larvas 3 abandonan el dorso. Por su parte, los niveles de IgM apenas varían durante todo el ciclo del parásito.

2.2. CITOQUINAS COMO FACTORES REGULADORES DE LAS INFECCIONES PARASITARIAS

Las citoquinas son proteínas solubles de bajo peso molecular que, en pequeñas concentraciones, intervienen en la regulación de las funciones celulares (Scheerlinck y Yen, 2005). Sus efectos son muy variados e incluyen desde la estimulación del crecimiento y diferenciación linfocitaria hasta la activación de células efectoras para la eliminación de microorganismos y otros antígenos.

A diferencia de las hormonas, las células que secretan citoquinas no están organizadas en órganos glandulares. De igual forma que otros compuestos peptídicos, las citoquinas inician sus acciones mediante la unión a receptores de membrana específicos, lo que explica que se necesiten cantidades muy pequeñas para producir un efecto biológico (Abbas *et al.*, 2002). Es también muy habitual que la misma citoquina tenga diversas acciones al actuar sobre diferentes células (pleiotropismo), así como que haya acciones redundantes entre diferentes citoquinas, sobre todo *in vitro*. El pleiotropismo puede explicarse por la existencia de receptores para una misma citoquina en células diferentes y/o por la existencia de diferentes cascadas de señalización intracelular. La redundancia se puede justificar, al menos en parte, por la existencia de receptores o vías de señalización compartidos por diferentes citoquinas (Ozaki y Leonard, 2002). Por último, como consecuencia de toda esta variedad en la señalización, es muy habitual encontrar casos de antagonismo (inhibición o bloqueo mutuo de sus efectos) o sinergismo (dos o más citoquinas producen un efecto que se potencia mutuamente) entre diferentes citoquinas.

Las células Th (células T "helper") evolucionan hacia dos subpoblaciones: de un lado las células Th1, están vinculadas con los procesos inflamatorios, la activación de macrófagos y la sensibilidad retardada, elaboran IL-2 e IL-3, interferón gamma, factor de necrosis tumoral, GM-CSF y linfoxina. Por otra parte, las células Th2 ayudan a las células B a sintetizar anticuerpos y secretan IL-3, IL-4, IL-5, IL-6 e IL-13. La IL-10 es secretada por ambas subpoblaciones en humanos. Se sabe que la interacción temprana del antígeno con los macrófagos o células dendríticas que producen IL-12 o con las que

secretan IL-4, desvía la respuesta hacia Th1 ó Th2, respectivamente. Las respuestas Th1 son eficaces ante infecciones intracelulares virales y microorganismos que se multiplican en macrófagos, mientras que las Th2 son buenas colaboradoras de las células B y parecen estar adaptadas para la defensa contra los parásitos que son vulnerables a las IgE (Figura 2.3).

No obstante, el paradigma Th1/Th2, postulado por Mosmann *et al.* (1986) en un modelo murino, no está tan bien definido en el ganado vacuno. Así, Brown *et al.* (1998) estudiaron la desviación de la respuesta inmunitaria mediante el aislamiento de las poblaciones linfocitarias predominantes tras la incubación con diversos patógenos. Mientras que la estimulación con antígenos de *Babesia* y *Mycobacterium* se traducían en un incremento de linfocitos Th1, la estimulación con antígenos de *Fasciola* producía una elevación de los Th0.

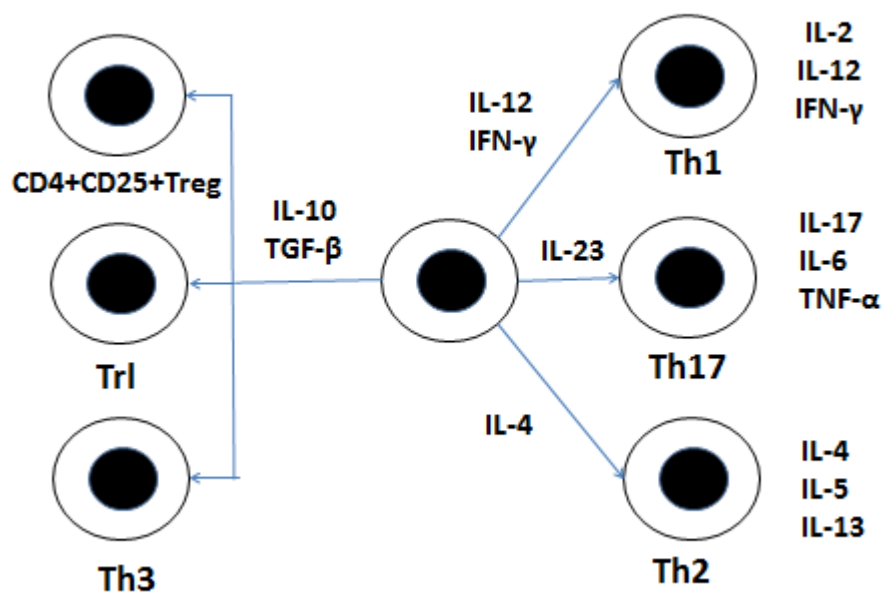


Figura 2.3. Polarización de la respuesta inmune y citoquinas implicadas

El predominio de una u otra respuesta frente a la estimulación antigénica fue estudiado igualmente por Rhodes y Graham (2002), quienes emplearon la oncocercosis y la tuberculosis como modelos extra e intracelulares, respectivamente. A pesar de observar tendencias diferentes en uno y otro caso, concluyeron que durante el desarrollo de la respuesta inmune, se suceden fases de desviación y no desviación, observándose, en

ocasiones, incrementos simultáneos de citoquinas Th1 y Th2. El trabajo se basó en la estimulación de linfocitos de ganado vacuno con antígenos solubles de *Onchocerca ochengi* y *M. bovis*, respectivamente. En el caso de la oncocercosis, mientras que los niveles de IL-4 se mantuvieron elevados durante toda la infección, los de IFN- γ experimentaron un descenso acusado tras la infección para elevarse nuevamente antes del período de patencia. Esta respuesta sugiere un predominio de la ruta Th2, si bien no existe una desviación total de la respuesta inmune, habiendo elevaciones puntuales de IFN- γ . Por el contrario, la estimulación con antígenos de *M. bovis* produjo una elevación de los niveles de IFN- γ sostenida en el tiempo, sugiriendo una respuesta Th1, con producción transitoria de IL-4.

El **interferón- γ** , también llamado interferón tipo II o inmunitario, es generado por las células T CD4⁺ y CD8⁺ activadas y por las células NK. El inicio de la transcripción es consecuencia de la activación antigénica y aumenta por acción de la IL-2 y la IL-12. Es un potente activador de los fagocitos mononucleares, el principal factor activador de los macrófagos y además contribuye a que las células T activen éstos. Aumenta la expresión de moléculas CMH de tipo I y II en una gran variedad de tipos celulares. De esta manera, amplifica la fase de reconocimiento de la respuesta inmunitaria favoreciendo la activación de las células T CD4⁺ colaboradoras. Actúa sobre los linfocitos T, favoreciendo su diferenciación desde células T CD4⁺ vírgenes hacia la subpoblación Th1 e inhibe la proliferación de las células Th2. No obstante, es una citoquina necesaria para la maduración de los CD8⁺. En los ratones se comprobó que actúa sobre las células B, favoreciendo la síntesis de las subclases IgG2a e IgG3 y la inhibición de la producción de IgG1 e IgE. De esta forma, el IFN- γ induce una respuesta humoral que también participa en la eliminación de agentes extraños. Activa los neutrófilos aumentando su metabolismo oxidativo y estimula la actividad citolítica de las células NK. Es un activador de las células endoteliales vasculares, favoreciendo la adhesión de los linfocitos T CD4⁺ y las alteraciones morfológicas que facilitan la extravasación de éstos. El IFN- γ también potencia muchas de las acciones del TNF- α sobre las células endoteliales. Finalmente, bloquea los efectos proliferativos de la IL-4 sobre las células Th2, previniendo la expresión de esta subpoblación de células T (Suk *et al.*, 1993). El efecto global del IFN- γ es, por tanto, favorecer reacciones con predominio de macrófagos e inhibir reacciones dependientes de IgE en las que intervienen los eosinófilos. Por esta razón, se trata de una citoquina de interés orientada

al estudio de enfermedades con predominio de la respuesta celular frente a la humoral, como por ejemplo la tuberculosis.

El **factor de necrosis tumoral- α** es el mediador principal de la respuesta frente a las bacterias gram-negativas y también puede desempeñar un importante papel en otras respuestas inmunitarias. La principal fuente celular del TNF- α son los fagocitos mononucleares activados por el lipopolisacárido de bacterias gram-negativas, aunque también puede ser secretado por las células T estimuladas por un antígeno, células NK y mastocitos activados. De esta manera, el TNF- α actúa como mediador tanto de la inmunidad innata como de la específica, y es un importante nexo de unión entre las respuestas inmunitarias específicas y la inflamación aguda. Entre sus acciones destacan las siguientes; el TNF- α hace que las células endoteliales vasculares expresen nuevos receptores de superficie que facilitan a los leucocitos su adhesión a la superficie de la célula endotelial, inicialmente a los neutrófilos, y posteriormente, los monocitos y linfocitos. Estas acciones propician el acúmulo de leucocitos en los focos inflamatorios y los activan para que destruyan agentes extraños. El TNF- α es especialmente potente para activar los neutrófilos, pero también estimula a eosinófilos y fagocitos mononucleares. La producción prolongada de concentraciones bajas de TNF- α da lugar a la regeneración tisular, ya que actúa como un factor de angiogénesis, induciendo la formación de nuevos vasos, y también supone un factor de crecimiento para los fibroblastos, induciendo depósito de tejido conectivo. Estos efectos del TNF- α son importantes en las respuestas inflamatorias locales contra agentes extraños. Si las concentraciones de esta citoquina son muy bajas, como ocurre en animales tratados con anticuerpos neutralizantes anti-TNF o en ratones con inhibición genética de TNF- α , se puede producir un fallo defensivo del organismo (Fong y Mosmann, 1990). De acuerdo con Kushibiki (2011), entre sus principales funciones inmunológicas destacan su actividad antitumoral, antimicrobiana y mediadora de la inflamación. Además, esta citoquina está implicada en la regulación del apetito, aumento de la temperatura, el metabolismo energético y el sistema endocrino.

La **interleuquina-10** es una citoquina producida principalmente por las células T CD4, monocitos, macrófagos y células B (Brown *et al.*, 1994), por macrófagos activados, algunos linfocitos y otros tipos celulares no linfocitarios (queratinocitos). Las dos principales actividades de la IL-10 son inhibir la producción de citoquinas por los macrófagos y las funciones accesorias de éstos en la activación de las células T. La IL-

10 en el macrófago da lugar a una disminución de la expresión del CMH II, reduce la endocitosis e inhibe la producción de las citoquinas proinflamatorias y la generación de NO. El efecto más directo de estas acciones es inhibir la respuesta inmunitaria innata y la específica mediada por células T (Mosmann, 1994).

En este sentido, Brown *et al.* (1994) demostraron que a diferencia del modelo murino, donde la IL-10 es producida exclusivamente por linfocitos Th2 e inhibe la secreción de citoquinas por parte de los linfocitos Th1, en ganado vacuno esta citoquina es expresada por las tres subpoblaciones de linfocitos e interviene en la regulación de ambas rutas. Más tarde, Chitkomckown *et al.* (1995) demostraron que la IL-10 inhibía la expresión del receptor p55 de la IL-2 y del IFN- γ , sin afectar a la producción de IL-2 e IL-4 por parte de clones de linfocitos colaboradores obtenidos a partir de ganado vacuno afectado de forma crónica con *Babesia bovis* o *Fasciola hepatica*. El papel inmunosupresor de esta citoquina fue estudiado también por Goff *et al.* (1998), quienes demostraron mediante RT-PCR su efecto sobre la expresión del IFN- γ y TNF- α .

La **interleuquina 4** se identificó inicialmente como una citoquina producida por las células T colaboradoras que estimulaba la proliferación de las células B, así como la expresión de las moléculas CMH de tipo II. Actualmente se sabe que su función principal es regular las reacciones inmunitarias mediadas por IgE y por los mastocitos/eosinófilos. La IgE es la mediadora fundamental de las reacciones de hipersensibilidad inmediata, y se cree que el aumento de la concentración de IL-4 es favorable para el desarrollo de alergias. Los anticuerpos IgE desempeñan también un papel importante en la defensa frente a las infecciones por artrópodos y helmintos.

Las principales fuentes celulares de IL-4 son los linfocitos T CD4+, y en concreto la subpoblación Th2. Los mastocitos y basófilos activados, al igual que algunas células T CD8+, son capaces igualmente de producir IL-4. La IL-4 es un factor de crecimiento y diferenciación para las células T, en particular para las Th2, es decir, favorece el desarrollo de células Th2 a partir de las células T vírgenes estimuladas por el antígeno; asimismo, interviene como un factor de crecimiento autocrino para las células Th2 diferenciadas, favoreciendo posteriormente la expansión de esta subpoblación (Abbas *et al.*, 2002). Asimismo, regula la expresión y secreción de IL-1, IL-6, IL-8, TNF- α e IFN- γ , lo que inhibe la respuesta Th1.

Con respecto a las **parasitosis**, la mayor parte de las investigaciones sobre citoquinas en ganado vacuno están orientadas al estudio de la respuesta celular en infecciones por protozoos intracelulares, siendo minoritarias las dedicadas a parásitos extracelulares.

En el caso de *Neospora caninum*, Staska *et al.* (2005) emplearon un test IFN- γ ELISPOT para la identificación de epitopos vacunales de la proteína de superficie NcSRS2 de *N. caninum*, utilizando linfocitos T sensibilizados de vacas Holstein infectadas de forma experimental. Sus resultados apoyan el empleo de péptidos o secuencias génicas NcSRS2 en las vacunas, ya que estas moléculas estimulan la proliferación de poblaciones de linfocitos T citotóxicos y células secretoras de IFN- γ .

Hope *et al.* (2005) desarrollaron métodos de detección de la IL-4 basados en el empleo de anticuerpos monoclonales de ratón capaces de detectar la IL-4 recombinante bovina y ovina con test ELISA y ELISPOT. Para su validación se emplearon antígenos de *F. hepatica* y *B. bovis*, observándose únicamente un aumento en los niveles de IL-4 en el primero de los casos. Este resultado se justifica porque en la infección por *B. bovis* predomina una respuesta de tipo celular mediada por el IFN- γ , mientras que en la fasciolosis prevalece una respuesta de tipo humoral.

Zaros *et al.* (2007) utilizaron la RT-PCR para estudiar las diferencias en la expresión de diversas citoquinas en dos razas de *Bos indicus*, resistentes y susceptibles a infecciones por nematodos intestinales. Asimismo, Fuertes *et al.* (2015) emplearon una RT-qPCR para estudiar la expresión de diversas citoquinas en el rumen de animales infectados con *Calicophoron daubneyi*, observando un incremento del IFN- γ y la IL-10 en presencia del parásito.

Los estudios de las distintas citoquinas en relación con los **artrópodos** son escasos, limitándose casi de forma exclusiva a las garrapatas, dada su importancia como vectores transmisores de múltiples enfermedades infecciosas y parasitarias. Los estudios han demostrado que las secreciones salivales inoculadas por las garrapatas producen un aumento de las citoquinas Th2, al tiempo que inhiben las asociadas a una respuesta de tipo Th1 (Ferreira y Silva, 1998; Kovar *et al.*, 2002).

En ganado vacuno, Ramachandra y Wikel (1992) demostraron que los extractos salivales de *Dermacentor andersoni* inhiben la síntesis de IL-1, IL-2, IFN- γ y TNF- α

por los macrófagos bovinos. Hay que destacar que en las infestaciones por garrapatas la IL-10 interfiere en la maduración funcional de las células dendríticas (De Smedt *et al.*, 1997).

En los ganglios linfáticos de ratones parasitados por garrapatas, D'Andrea *et al.* (1993) observaron una reducción de la IL-12 debida probablemente a una producción elevada de IL-10 y de IL-4. De esta forma la IL-10, junto con la IL-4, suprimiría la síntesis de la IL-12. Ferreira y Silva (1998) estudiaron el efecto de la infestación por garrapatas en la expresión de diferentes citoquinas en ratones, demostrando que las células linfáticas cultivadas en presencia del mitógeno Con A expresaban un perfil Th2, representado por la secreción aumentada de IL-4 e IL-10. Por el contrario, la IL-2, el IFN- γ y la IL-12 se inhibían de forma significativa. Estos resultados indican que las señales de las secreciones salivales de las garrapatas podrían modular la respuesta inmunitaria del hospedador hacia una respuesta tipo 2. Por otro lado, Kopecky *et al.* (1999) evaluaron el efecto de un componente antigénico de la saliva de *Ixodes ricinus* sobre la secreción de IFN- γ e IL-10, comprobando que el SGE inyectado a ratones disminuía notablemente la secreción de IFN- γ en cultivos de células de bazo, pero aumentaba la secreción de IL-10, lo que podría explicar la mayoría de los efectos inmunomoduladores de las secreciones salivales de la garrapata. Brake y De León (2012) investigaron el efecto de extractos de glándulas salivares de *Rhipicephalus microplus* sobre macrófagos de ganado vacuno, comprobando que la exposición al antígeno resultaba en un descenso de los niveles de TNF- α , IFN- γ e IL-12, al tiempo que no alteraba la producción de IL-4. Igualmente, Domingues *et al.* (2014) detectaron variaciones en la expresión de IL-10 y TNF- α en ganado vacuno resistente a esta garrapata en relación a ganado susceptible, poniendo en evidencia el papel protector de estas citoquinas.

En otros artrópodos, Zhao *et al.* (2009) identificaron tres péptidos inmunoreguladores en la saliva de dípteros de la especie *Tabanus pleskei* que inhibían la secreción de IFN- γ mediante la estimulación de la producción de IL-10. Este mismo efecto fue observado por Sarre *et al.* (2015) en linfocitos estimulados procedentes de vacuno infestado de forma natural con *Psoroptes ovis*.

En la **miasis** provocada por *Lucilia sericata* en ganado ovino, Elhay *et al.* (1994) detectaron a nivel dérmico un aumento de la expresión de las citoquinas IL-1 α , IL-1 β ,

IL-6, IL-8, IL-2 e IFN- γ junto con una intensa infiltración de granulocitos, células T y macrófagos. Por otra parte, el papel de la respuesta inmunitaria para determinar la resistencia o receptividad a la infección por *Lucilia* se considera de vital importancia en la selección de animales genéticamente resistentes. Así mismo, observaron que los niveles de IFN- γ aumentaron levemente en los animales primoinfectados a las 100 h.p.i, mientras que en infecciones secundarias todas las ovejas demostraron mayor aumento de la respuesta del IFN- γ con niveles elevados a las 72 horas. En cuanto a la expresión de las citoquinas a nivel dérmico, las IL-6 y 8 aumentaban rápidamente a las 6 horas post-infestación, manteniéndose durante las siguientes 48 horas, pero no observaron este aumento en el caso del TNF- α . Otras citoquinas como la IL-2, IFN- γ e IL-10 también se detectaron a las 6 horas post-infestación; no obstante el IFN- γ no se demostró en todos los animales. Cabe destacar la ausencia de IL-4 en todos los animales. Bowles *et al.* (1994) encontraron un aumento en el nivel de IFN- γ y IL-2 tras la primoinfección por *Lucilia cuprina*, siendo más elevado en las ovejas reinfestadas. Elkington *et al.* (2009) comprobaron mediante citometría de flujo que el antígeno de excreción-secreción de larvas de *Lucilia cuprina* inhibía la activación y proliferación de linfocitos de ganado ovino. De la misma forma, constataron mediante RT-PCR que dicha proteína ejercía un efecto inhibitor sobre la transcripción de IFN- γ , IL-4, IL-10 e IL-13.

Con respecto a la **hipodermosis**, Panadero *et al.* (2009), en cultivos de linfocitos de vacas infestadas por *Hypoderma*, observaron que la incubación con hipodermina A producía una elevación significativa en los niveles de IFN- γ , al mismo tiempo que una supresión de los niveles de IL-10, lo que indicaría una respuesta de tipo Th1. Esto último sucedía igualmente en la incubación con hipodermina B, sin verse afectada la producción de IFN- γ e IL-4. La hipodermina C, por su parte, no producía cambios significativos en los niveles de las citoquinas estudiadas. Por otro lado, la incubación con extracto total se traducía en un drástico descenso de los niveles de citoquinas.

Dacal *et al.* (2009) estudiaron las variaciones de los perfiles de citoquinas a nivel local y sistémico durante la fase de penetración larvaria de *H. lineatum* en ganado vacuno infectado de forma experimental. En relación a la IL-4, modulador clave de la respuesta humoral, se observó una elevación en sus niveles 6 hpi en los animales reinfestados. Los niveles séricos de anticuerpos permanecieron por debajo del límite de detección, conforme a lo observado previamente por diversos autores (Pruett y Barrett,

1985; Pruett *et al.*; 1987; Colwell y Baron, 1990; Panadero *et al.*, 2001) quienes concluyeron que los anticuerpos frente a *Hypoderma* no se detectan hasta las 4-6 semanas pi. Esta elevación local de las células IL-4⁺ durante la fase de penetración larvaria va acompañada por el incremento de células plasmáticas y de eosinófilos (López *et al.* 2005).

En relación con la IL-10, Dacal *et al.* (2009) observaron en animales reinfestados retraso en el incremento de los niveles de esta citoquina en comparación con los primoinfestados, lo que se traduciría en una respuesta inflamatoria más precoz y en daños tisulares más intensos en los primeros. De acuerdo con estos resultados, la función básica de la IL-10 durante la fase de penetración sería la de inhibir la respuesta del hospedador y favorecer la migración larvaria. Con respecto al IFN- γ , mientras que el número de células productoras de esta citoquina se eleva a nivel local durante la fase de penetración larvaria, apenas hay variaciones séricas en este período.

En un trabajo posterior, Dacal *et al.* (2011) caracterizaron por inmunohistoquímica la respuesta inflamatoria local cutánea en ganado vacuno infectado experimentalmente con larvas 1 de *H. lineatum*, comprobando que mientras en animales primoinfestados existía un predominio de células T CD4⁺, en los reinfestados primaban los linfocitos B, lo que en este caso apuntaría al predominio de la respuesta humoral. Por su parte Panadero *et al.* (2011) estudiaron el efecto regulador del IFN- γ y de la IL-4 en la respuesta linfoproliferativa inducida por el mitógeno Con A, solo o en presencia de distintos antígenos obtenidos de L1 de *H. lineatum*, así como sobre la producción de IL-10 e IL-12 en cultivos de linfocitos obtenidos de terneros no infestados. Estos autores sugieren que el IFN- γ podría jugar un papel importante en la respuesta inflamatoria frente a *Hypoderma* a través de la producción de la citoquina proinflamatoria IL-12 y el descenso de la citoquina antiinflamatoria IL-10. Por otra parte, el incremento en la respuesta linfoproliferativa inducida por la IL-4 no se vio acompañada del aumento significativo de los niveles de IL-10 e IL-12.

Vázquez *et al.* (2012) estudiaron la evolución de los perfiles séricos de citoquinas a lo largo del ciclo natural de *H. lineatum*. En relación a los niveles de IFN- γ , observaron un descenso en los meses de octubre y enero en que se produce la fase manteniéndose constantes durante la penetración y migración larvaria. Con respecto a los valores séricos de IL-4, se observó un marcado descenso en el mes de enero, justo

antes de la llegada de las larvas 1 al tejido subcutáneo del dorso. Por otro lado, se puso de manifiesto un incremento en el mes de febrero, cuando los nódulos larvarios comenzaron a ser visibles. La evolución de los patrones séricos de las citoquinas estudiadas sugiere el predominio de una respuesta tipo Th1 en fases tempranas de la infestación, caracterizada además de por el aumento de los niveles de IFN- γ , por la elevación de IgG2. Por el contrario, en la fase de migración hacia el dorso, lo que predomina es una respuesta Th2, en la que se produce una elevación conjunta de IL-4 e IgG1.

2.2.1. TÉCNICAS PARA LA DETECCIÓN DE CITOQUINAS

La detección de citoquinas en suero o en cultivos celulares está condicionada por diversos factores como la baja concentración a la que circulan estas moléculas o la presencia de sustancias inhibidoras (proteínas, receptores solubles, anticuerpos, etc.) en la muestra, que pueden interferir en las pruebas. En este sentido, la toma de muestras para la detección de citoquinas ha de ser muy cuidadosa, para prevenir la contaminación con endotoxinas que puedan inducir la liberación de las mismas por parte de las células tras el muestreo (Bienvenu *et al.*, 1998).

Por otra parte, las técnicas de bioensayo empleadas hace unos años tenían limitaciones importantes como la falta de especificidad, el elevado tiempo de análisis y la baja reproducibilidad (Tabla 2.1). Este tipo de pruebas se basaban en la detección de respuestas biológicas como los tests de proliferación, las pruebas de citotoxicidad, la actividad antiviral, la inducción de moléculas de superficie, la actividad quimiotáctica o la inhibición de la secreción de citoquinas (Thorpe *et al.*, 1992). Estas pruebas dieron paso a los inmunoensayos y a determinadas técnicas mixtas, como el ELISPOT, que presentaban múltiples ventajas (Tabla 2.1).

El empleo de estas técnicas a partir de cultivos celulares constituye una aproximación de lo que sucede en el organismo vivo, al estimular las células con los correspondientes antígenos (Doherty *et al.*, 2005). De acuerdo con De Groote *et al.* (1992), es necesario emplear mitógenos como el lipopolisacárido (LPS) o la fitohemaglutinina (PHA) para estimular la producción de citoquinas por parte de las

células, particularmente en el caso de citoquinas proinflamatorias (IL-1, IL-6, IL-8, TNF- α) y citoquinas Th1/Th2 (IFN- γ , IL-10...).

Posteriormente, se desarrollaron otros procedimientos como la citometría de flujo, la inmunohistoquímica, la hibridación *in situ* o la RT-PCR, que son fundamentales para conocer aspectos relacionados con su regulación y funcionamiento (Bienvenu *et al.*, 1998).

Tabla 2.1. Características comparativas de bioensayos e inmunoensayos para la detección de citoquinas (adaptado de Bienvenu *et al.*, 1998)

Bioensayos	Inmunoensayos
Alta sensibilidad (límite de detección <1pg/ml)	Menor sensibilidad (límite de detección >1pg/ml)
Baja especificidad	Alta especificidad
Detección de moléculas bioactivas	Detección de moléculas antigénicas
Limitado rango de análisis	Amplio rango de análisis
Prolongado en el tiempo (días)	Rápido (horas)
Baja precisión (c.v. 20-100%)	Alta precisión (c.v. 5-10%)

2.2.1.1. ELISA sándwich

El ELISA fue una de las primeras técnicas empleadas en la detección de citoquinas, gracias, entre otras razones, a su elevada reproducibilidad. Esta técnica se basa en el empleo de dos anticuerpos específicos, el anticuerpo primario que captura el antígeno, en este caso, la citoquina, y el anticuerpo secundario, que posibilita su detección y amplificación (Leng *et al.*, 2008).

Como se aprecia en la figura 2.4, una vez que la citoquina ha sido capturada, se añaden a la reacción una enzima y un sustrato cromógeno; el color de la misma se analiza con el espectrofotómetro (Crowther, 2000).

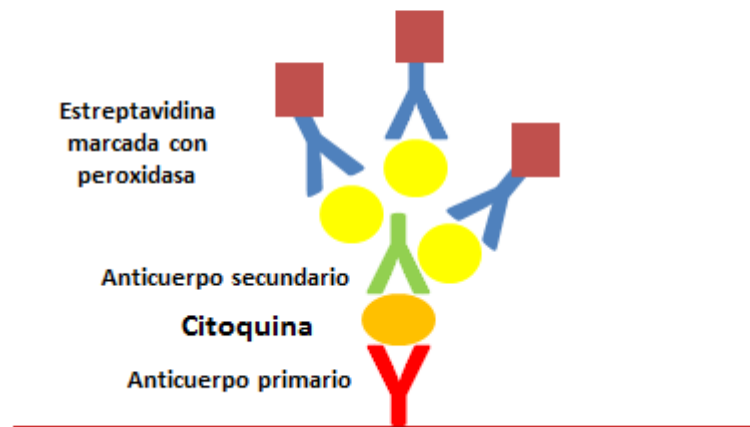


Figura 2.4. Esquema de la técnica ELISA para detección de citoquinas

Durante muchos años, el ELISA se ha considerado el método de referencia para la detección de citoquinas, existiendo numerosos kits comerciales para ello. Sus principales ventajas son su simplicidad, fácil lectura, rapidez y bajo coste (Crowther, 2000).

Sin embargo, la eficacia del ELISA está limitada por aspectos como la calidad de los anticuerpos, el fabricante y la experiencia del operador (Aziz *et al.*, 1999). Por otra parte, el ELISA sólo permite detectar una citoquina de cada vez, lo que constituye un factor limitante a la hora de estudiar varias citoquinas en una determinada enfermedad. Asimismo, es difícil comparar los resultados de dos ELISAs para dos citoquinas distintas (Leng *et al.*, 2008). De la misma manera, el intervalo en el que existe una relación lineal entre la concentración de citoquinas y la absorbancia es muy estrecho en relación a otras técnicas como la citometría de flujo. Así, debido a su bajo límite de detección, si la concentración de citoquinas en la muestra es muy pequeña, no es capaz de detectarla.

2.2.1.2. ELISPOT

El Enzyme-linked immunosorbent spot (ELISPOT) o enzimoimmunoanálisis basado en el recuento de puntos, se desarrolló inicialmente como método para detectar células B secretoras de anticuerpos (Czerkinski *et al.*, 1988; Sedgwick y Czerkinsky, 1992). Posteriormente, se ha adaptado para cuantificar células T antígeno-específicas mediante la secreción de moléculas efectoras como son las citoquinas. Actualmente, el ELISPOT se emplea en el estudio de un elevado número de citoquinas en diversas especies animales, desde ratones a primates (Herr *et al.*, 1996; Rinisland *et al.*, 2000; Guerkov *et al.*, 2003).

La técnica del ELISPOT es muy similar al ELISA convencional ya que se basa en el mismo principio de unión “sándwich”. La principal diferencia entre ambos es que en el caso del ELISPOT se incuban células vivas directamente en la placa, por lo que constituye una combinación de inmunoensayo y bioensayo (Tabla 2.2).

Mientras que el ELISA determina la concentración total de citoquina secretada, el ELISPOT pone de manifiesto el número de células que producen dicha citoquina, es decir, la frecuencia de las células T antígeno-específicas (Czerkinsky *et al.*, 1988). Además, el ELISPOT puede ser hasta 400 veces más sensible que el ELISA, ya que la citoquina es capturada directamente sobre una fase sólida antes de diluirse en el sobrenadante, evitándose así la degradación por parte de proteasas o la unión inespecífica a receptores solubles (Tanguay y Killion, 1994; Lehmann y Zhang, 2012).

Por otro lado, el ELISPOT presenta el umbral de detección más bajo de entre las técnicas más comunes para la medición de linfocitos T, como la linfoproliferación o el ensayo con linfocitos T citotóxicos, que implican, entre otras cosas, el uso de radiactividad. Así, Karlsson *et al.* (2003) compararon los resultados del ELISPOT y la citometría de flujo, concluyendo que el primero es más adecuado para la detección de respuestas linfocitarias a bajo nivel y para la catalogación como positivas o negativas.

Además de su elevada sensibilidad, otras de las ventajas del ELISPOT son la posibilidad de detectar linfocitos T funcionales, un fácil desarrollo y un alto potencial de cribado. Debido al corto periodo de incubación *in vitro*, los resultados reflejan con bastante precisión la frecuencia de células T *in vivo*.

Tabla 2.2. Comparación del ELISA y el ELISPOT para la detección de citoquinas a partir de cultivos de CMSP (adaptada de Cox *et al.*, 2006)

ELISA	ELISPOT
Producción de citoquinas de todas las células de un pocillo (total)	Producción de citoquinas de cada una de las células de un pocillo (individual)
No detecta la frecuencia de células secretoras	Detecta la frecuencia de células secretoras
Citoquina en fase líquida	Citoquina en fase sólida
La citoquina puede diluirse en el sobrenadante, ser capturada por células adyacentes o degradada	La citoquina se detecta recién liberada
Permite detectar varias citoquinas en la misma muestra	Permite detectar una sola citoquina en cada muestra
El ensayo se realiza en una fase líquida, la reacción de color se degrada con rapidez	Las placas de ELISPOT pueden guardarse y releerse o conservar una imagen

El método ELISPOT se fundamenta en el empleo de células mononucleares de sangre periférica (CMSP), que son estimuladas *in vitro* con antígenos (péptidos sintéticos, proteínas recombinantes o el propio agente patógeno). Las células se incuban en placas de pocillos con membrana de nitrocelulosa, previamente tapizados con un anticuerpo frente a la citoquina analizada. Tras la incubación, la producción local de citoquinas alrededor de las células se pone de manifiesto con un anticuerpo secundario marcado con una enzima, alcalin-fosfatasa o peroxidasa, y un sustrato cromógeno (Sedegah, 2015). Así, cada célula productora de citoquina se evidencia como un punto en la membrana. El número de células por pocillo representa la frecuencia de células T productoras de citoquinas (Cox *et al.*, 2006).

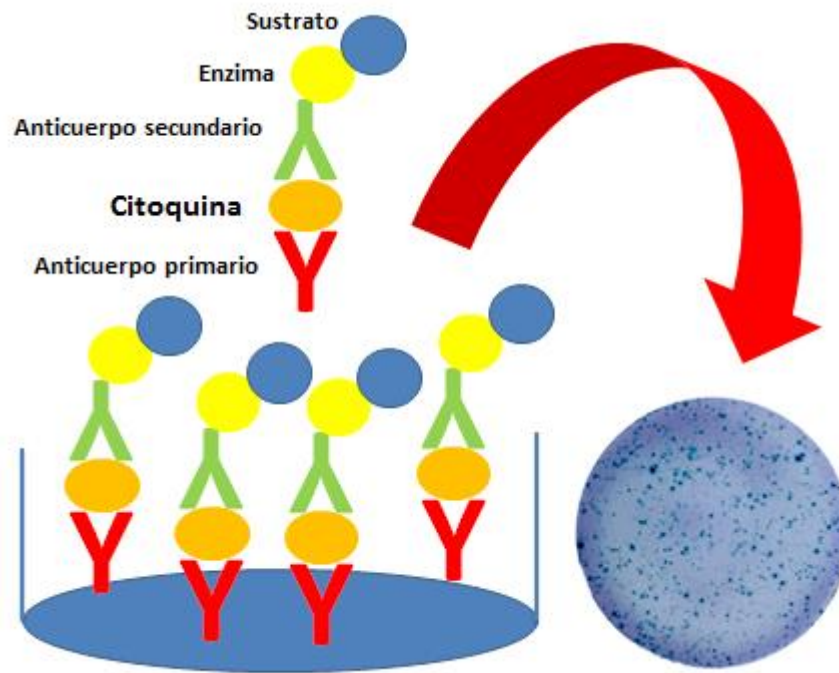


Figura 2.5. Esquema de la técnica ELISPOT para la detección de citoquinas

Originalmente, uno de los principales problemas del ELISPOT era la escasa repetibilidad de la técnica, ya que al comparar los resultados de diferentes grupos de investigación de varias pruebas e incluso duplicados de la misma se observaba una variabilidad muy alta. Igualmente, la visualización y recuento de puntos en microscopio por parte del operador era un factor a tener en cuenta (Cox *et al.*, 2006). Recientemente, Sundaraman *et al.* (2015) demostraron que la repetibilidad de la técnica es mayor empleando el software SmartCount® con respecto al BasicCount®. Mientras que el primero establece los parámetros en bases a la estadística, en el segundo es el operador quien los establece de forma subjetiva, aumentando enormemente el coeficiente de variación entre distintos laboratorios.

Progresivamente, la técnica del ELISPOT se ha ido perfeccionando gracias a la introducción de placas con membranas de polifluoruro de vinilideno (PVDF), las pruebas con anticuerpos y la aparición de distintos kits comerciales (Shaw *et al.*, 1993). Actualmente existen lectores y paquetes de software que permiten reducir la variabilidad entre pocillos con células del mismo donante incubadas en diferentes condiciones, mejorando así la sensibilidad de la técnica. Sin embargo, la lectura de placas (Janetzki *et al.*, 2004) sigue estando, de alguna manera, sujeta a la persona que la

realiza. En este sentido, se han desarrollado avances para estandarizar el procedimiento, como el empleo de una mezcla de péptidos control para establecer los parámetros de definición de puntos con ayuda de un software (Currier *et al.*, 2002).

2.2.1.3. Inmunohistoquímica

Esta técnica se fundamenta en la detección de antígenos en tejidos mediante el uso de anticuerpos específicos. Así, la unión antígeno-anticuerpo se evidencia mediante una reacción inmunohistoquímica visible al microscopio. Aunque el principio en el que se basa es sencillo, la metodología de esta técnica se ha ido perfeccionando para conseguir mejores valores de sensibilidad y especificidad.

A este respecto, la selección de los anticuerpos resulta fundamental, ya que algunos de los empleados en ELISA no son válidos para inmunohistoquímica debido, entre otras razones, a diferencias en su conformación molecular, epitopos o a la existencia de precursores de citoquinas (Schauer *et al.*, 1996). En este sentido, los anticuerpos policlonales presentan una mayor afinidad y reactividad que los monoclonales, siendo menor su especificidad (Hayat, 2002). Dado que los anticuerpos policlonales pueden identificar múltiples epitopos del antígeno, pueden dar lugar a reacciones cruzadas y falsos positivos, uniéndose a proteínas inespecíficas (Mighell *et al.*, 1998).

La inmunohistoquímica consta de tres fases fundamentales: fijación de las células, permeabilización y adición de anticuerpos específicos frente al antígeno (Figura 2.6). Así, la correcta fijación de los tejidos es clave para preservar los componentes estructurales de las células y facilitar su tinción (Fung *et al.*, 1992). En este sentido, el formaldehído es el compuesto más empleado para fijación, tanto en histología como en inmunohistoquímica, ya que preserva péptidos fundamentales, al tiempo que la estructura de los orgánulos celulares (Ramos-Vara, 2005).

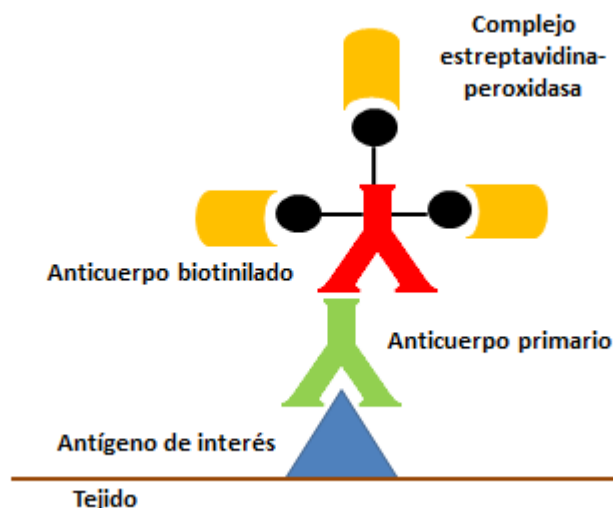


Figura 2.6. Esquema de la inmunohistoquímica para la detección de citoquinas

Teniendo en cuenta que el proceso de fijación altera la estructura terciaria de las proteínas, es necesario aplicar técnicas de desenmascaramiento del antígeno para optimizar la reacción. El método empleado no depende únicamente de la fijación, sino también del tipo de anticuerpo empleado. En ausencia de desenmascaramiento antigénico, la detección de antígenos es más probable empleando anticuerpos policlonales (Ramos-Vara y Beissenherz, 2000).

En cuanto a los procedimientos más comunes de desenmascaramiento antigénico, destacan el empleo de enzimas (Huang, 1975) y los métodos basados en calor. Aunque existen una gran número de enzimas, una de las más empleadas es la proteinasa K, que presenta una buena actividad a temperatura ambiente y se puede usar en dispositivos automáticos. Sin embargo, debido a desventajas como la alteración de la estructura tisular o la destrucción de determinados epitopos han sido sustituidos por métodos basados en el empleo de calor (Shi *et al.*, 1991), optimizados posteriormente por Hayat (2002); quien demostró que calentar a altas temperaturas (100°C) durante cortos períodos de tiempo da mejores resultados que aplicar temperaturas bajas durante un tiempo prolongado. En la actualidad, la opción más común para el desenmascaramiento antigénico son calentadores automáticos (90-95°C), en los que las muestras se incuban 20 minutos en un buffer salino, cuyo pH varía en función del antígeno. Mientras que algunos antígenos solo se desenmascaran a pH bajo, otros lo hacen a pH alto y un tercer grupo, en un amplio rango de pH (Shi *et al.*, 1995).

Por otro lado, la visualización de la reacción antígeno-anticuerpo requiere del empleo de algún sistema de detección, ya sean fluorocromos, enzimas o metales (Lucocq y Roth, 1985; Taylor *et al.*, 2002). De entre estas moléculas, las enzimas (peroxidasa, alcalin-fosfatasa, glucosa oxidasa...) son las más empleadas; en presencia de un sustrato y un cromógeno producen un precipitado de color en los puntos de unión antígeno-anticuerpo. La mayoría de los cromógenos confieren un color marrón, rojo o azul a la reacción. La elección de la enzima y del cromógeno dependerá de factores como la intensidad de la reacción, la localización del antígeno o la presencia de pigmentos internos. La enzima más empleada a este respecto es la peroxidasa y el cromógeno más habitual, la 3,3' diaminobencidina (DAB), insoluble en disolventes orgánicos y responsable de una coloración marrón.

La elección del contraste dependerá del color del cromógeno; los más frecuentes son la hematoxilina (azul), el verde metilo y el “rojo nuclear”. La función del contraste es teñir ligeramente el tejido sin interferir en la visualización del precipitado (Van Hecke, 2002).

A pesar de la existencia de métodos directos de revelado, basados en el empleo de un anticuerpo primario marcado, Coons *et al.* (1955) desarrollaron métodos indirectos para aumentar la sensibilidad de la técnica. En dichos sistemas, el anticuerpo primario no está marcado, conservando su actividad y haciendo posible el empleo de un mismo anticuerpo secundario para detectar varios anticuerpos primarios, provenientes de la misma especie (Polak, 2003). Uno de los métodos más comunes es el del complejo avidina-biotina (ABC), cuya principal desventaja es el elevado ruido de fondo, debido a la unión de la molécula de avidina a lectinas del tejido (Polak, 2003). Actualmente, predomina el empleo de polímeros compactos (EnVision®, PowerVision®, etc), como alternativa a los sistemas ABC (Sabattini *et al.*, 1998; Petrosyan *et al.*, 2002). Esta técnica es más simple y más sensible, al tiempo que elimina el problema del ruido de fondo.

El ruido de fondo en inmunohistoquímica puede estar asociado a múltiples causas; una de las más importantes es la actividad de la peroxidasa endógena, que se encuentra de forma natural en los eritrocitos y granulocitos y reacciona con la DAB, generando una coloración marrón indiferenciable de la tinción específica. Aunque gran parte de su actividad se inhibe durante la fijación, el pretratamiento de las secciones

histológicas con peróxido de hidrógeno a distintas concentraciones (0,003-3%) en función del tejido, resulta fundamental para suprimir la actividad enzimática (Straus, 1979; Elias, 2003). Otras causas posibles son interacciones hidrofóbicas, iónicas o electrostáticas; además de la existencia de aldehídos libres, el secuestro de antígenos o la presencia de diversos pigmentos (Ramos-Vara, 2005).

Entre las principales limitaciones de la inmunohistoquímica se encuentran la imposibilidad de detectar bajas cantidades de citoquinas intracelulares y el ruido de fondo debido a la unión inespecífica de los anticuerpos a las proteínas del tejido, particularmente en áreas de necrosis.

2.2.1.4. RT-qPCR

Desde que Wittwer *et al.* (1997) pusieron a punto esta técnica, la RT-PCR se ha ido perfeccionando, hasta ser considerada el método de elección para la determinación de la expresión de genes en modelos animales. Se trata de una técnica muy sensible, que permite analizar un determinado gen a partir de cantidades muy pequeñas de ARN (Freeman *et al.*, 1999). Asimismo, la introducción de nuevos procedimientos que emplean fluorescencia, permiten cuantificar los productos de la PCR “a tiempo real”, durante la fase exponencial de la reacción. Es por eso que la RT-qPCR es hoy en día el método más empleado para la detección de la expresión de citoquinas en rumiantes, pues presenta una sensibilidad muy alta (Giuletti *et al.*, 2001).

En la RT-qPCR, se emplea ARN en lugar de ADN como molde inicial para la reacción. Así, la extracción de ARN a partir de la muestra es un requisito previo en la realización de esta técnica que consta de las siguientes fases: (1) extracción del ARN (2) retrotranscripción y síntesis de una cadena de ADN complementaria (ADNc) y (3) amplificación de la misma mediante PCR estándar (Figura 2.7).

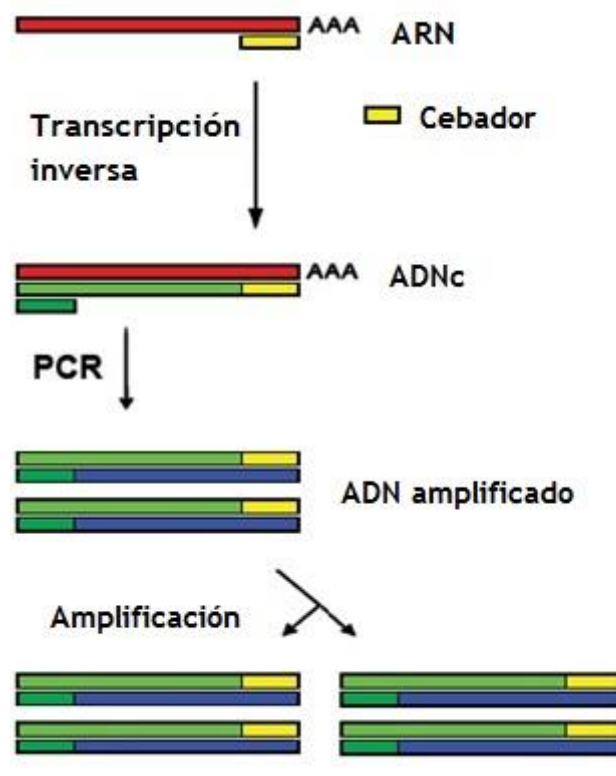


Figura 2.7. Desarrollo secuencial de la RT-PCR para la detección de citoquinas

La extracción del ARN es un paso muy importante que condiciona en gran medida la calidad de la RT-PCR, debido a que la degradación del mismo constituye un grave problema de cara a la ejecución de la técnica. A diferencia del ADN, el ARN es más inestable; por esta razón, es especialmente importante seguir rigurosos protocolos a la hora de extraer ácidos nucleicos, así como almacenarlos en las condiciones adecuadas. Para obtener buenos resultados en la RT-PCR, el ARN ha de reunir los siguientes requisitos: debe ser de una muy buena calidad, debe estar libre de ADN, de inhibidores y de nucleasas para su almacenamiento (Bustin y Nolan, 2004).

Actualmente existen numerosos kits comerciales para la extracción de ARN, dependiendo de la muestra a analizar. Algunos incluyen un tratamiento con ADNasas para obtener un mayor nivel de pureza, si bien resultan más laboriosos y costosos. Para cultivos celulares cuya concentración supera los 10 millones de células se suele utilizar el método del TRizol o un kit comercial (Overbergh *et al.*, 2003). Finalmente, la concentración del ARN purificado se determina en espectrofotómetro a 260 nm.

Tras la extracción, la pureza del ARN debe testarse mediante electroforesis en gel de agarosa para verificar su integridad a través de la presencia de las bandas 28S y 18S del ARN ribosómico. Esta técnica requiere grandes cantidades de ARN; por eso, para estandarizar el análisis de un elevado número de muestras, lo más conveniente es el empleo de kits comerciales (Bustin y Nolan, 2004).

El primer paso en la RT-PCR es la producción de una cadena de ADN complementaria a la cadena de ARNm por acción de la enzima transcriptasa inversa, siendo este paso la fuente de mayor variabilidad en la RT-PCR (Freeman, 1999). Esto se debe a que la enzima es muy sensible a las sales y restos de alcohol y fenol, resultantes de la extracción del ARN.

Para iniciar la síntesis de ADN, la enzima requiere un cebador de nucleótidos que se une al ARN, de forma que la cadena de ADN se extiende hacia el extremo 5' del ARNm. Estos cebadores pueden ser específicos para un gen determinado o no. Los cebadores aleatorios o “random hexamer primers” contienen todas las combinaciones posibles de un oligonucleótido de seis bases y se unen a todas las moléculas de ARN presentes en la muestra. De la misma forma, oligonucleótidos formados por residuos de deoxitimidina, llamados oligo(dT) se unen a la cola poliadenilada 3' presente en la mayoría de los ARNm. Este método maximiza el número de genes analizados a partir de una misma muestra de ARNm. Por su parte, el uso de cebadores específicos aumenta la especificidad y disminuye el ruido de fondo; sin embargo, la reacción solo permite analizar un gen de cada vez (Freeman, 1999).

La PCR puede realizarse, por tanto, en un único paso, de forma que la síntesis de ADNc y la amplificación del mismo tienen lugar en el mismo tubo o en dos etapas consecutivas, donde estos procedimientos se realizan de forma separada (Wong y Medrano, 2005). A pesar de que la realización en un único paso disminuye la variabilidad, el ARN de la muestra se degrada con suma facilidad. Además, este método no es adecuado para muestras que se quieran investigar varias veces y presenta menor sensibilidad que el procedimiento en dos fases (Battaglia *et al.*, 1998).

La PCR en dos etapas separa la retrotranscripción de la PCR, haciendo posible realizar varias pruebas a partir de diluciones de ADNc. Teniendo en cuenta que la RT se caracteriza por presentar una eficacia muy variable, el uso de diluciones de la muestra permite asegurarse de que en distintos ensayos se emplea siempre la misma cantidad. El

protocolo en dos fases es el más adecuado cuando se utilizan colorantes que se unen al ADN, como el SYBR Green I, ya que es más fácil eliminar los dímeros de los cebadores, manipulando la temperatura (Vandesompele *et al.*, 2002). La única desventaja de este método es que las posibilidades de contaminación del ADN son mayores.

Así, la PCR permite sintetizar numerosas copias de un fragmento de ADN, utilizando una enzima que puede trabajar a temperaturas muy elevadas, la Taq polimerasa. Para que la reacción tenga lugar se necesitan, además de la enzima, los siguientes componentes: una cadena de ADN, oligonucleótidos llamados cebadores, dinucleótidos (dNTPs), $MgCl_2$ y otras sales. Así la PCR suele llevarse a cabo a partir de una alícuota de la reacción de retrotranscripción o añadiendo a esta los componentes de la PCR (Pfeffer *et al.*, 1995).

La PCR consta de tres etapas fundamentales: desnaturalización, alineamiento y extensión, con temperaturas variables. El número de ciclos depende de la proporción del gen presente en la muestra y de la eficacia de la reacción. De esta manera, cuanto menor es la expresión de un determinado gen, mayor número de ciclos son necesarios para detectarlo (Freeman, 1999).

Otra cuestión muy importante relacionada con el desarrollo de la RT-PCR es la presencia de inhibidores, ya que existen numerosos componentes en la sangre y tejidos animales que pueden inhibir este tipo de pruebas. Asimismo, otros compuestos presentes en el medio de cultivo celular o agentes empleados en la extracción del ARN pueden inhibir la reacción (Rossen *et al.*, 1992).

El último paso en la RT-PCR es la detección y cuantificación de los productos amplificados. Así, los productos de la reacción deben separarse para poder discernir el gen de interés del estándar. Existen dos métodos para la detección de los productos de PCR: los métodos “a punto final” y “a tiempo real”. Mientras que los primeros analizan la reacción una vez completada, los segundos monitorizan esta mientras tiene lugar. Las ventajas de los métodos “a tiempo real” son que minimizan el error y aportan datos sobre lo que sucede en cada ciclo. Actualmente existen un gran número de técnicas para visualizar los productos de la PCR basadas en el empleo de fluorescencia. Los más habituales son los métodos TaqMan®, que se fundamentan en la actividad exonucleasa 5'-3' de la Taq polimerasa (Holland *et al.*, 1991) y los colorantes como el SYBR Green

I, que se unen al ADN y permiten detectar los productos amplificados en base a las curvas de fusión (Ririe *et al.*, 1997).

Dentro de los métodos específicos, el sistema Taqman® se basa en el empleo de tres oligonucleótidos; un cebador sentido, otro anti-sentido y una sonda, específicos para el gen a amplificar (Figura 2.8). La sonda es un oligonucleótido con un colorante marcador en el extremo 5' y un colorante quelante en el extremo 3'. Así, cuando la sonda está intacta el colorante quelante, absorbe la fluorescencia del colorante de marcaje debido a su proximidad. Por acción de la actividad 5' exonucleasa de la Taq polimerasa, la sonda se hidroliza y el colorante marcador se separa del quelante. Durante la PCR, si el gen está presente, la sonda se une al mismo, resultando en un aumento de la fluorescencia. Este incremento se mide ciclo a ciclo durante el proceso de amplificación (Heid *et al.*, 1996, Gibson *et al.*, 1996). Así, la eficacia de este método depende en gran medida de la actividad nucleasa de la enzima. En este sentido algunas de las polimerasas disponibles en el mercado no son adecuadas para RT-PCR (Kreuzer, 2000).

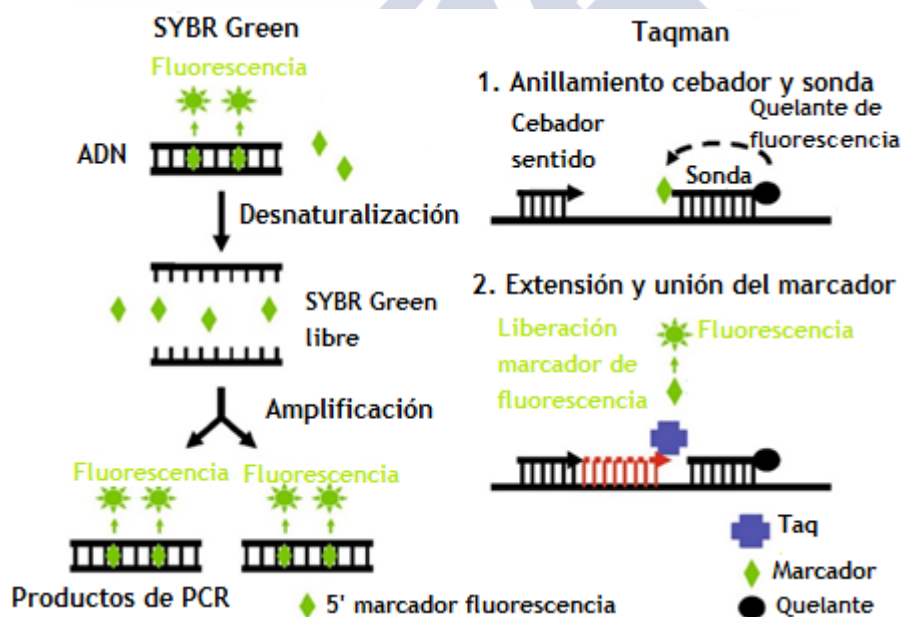


Figura 2.8. Métodos de detección de productos de PCR basados en el uso de fluorescencia

En relación a los métodos inespecíficos, destaca el SYBR Green I, un colorante que se une a las cadenas de ADN, emitiendo fluorescencia (Ishiguro *et al.*, 1995). La principal ventaja de este método, de acuerdo con Simpson *et al.* (2000), es que puede aplicarse a cualquier par de cebadores, resultando más económico que el sistema

TaqMan®. Sin embargo, existe riesgo de amplificar productos inespecíficos, ya que el colorante se une a cualquier cadena de ADN, incluyendo los cebadores diméricos (VanGuilder *et al.*, 2008). Este problema puede solventarse con el estudio de las curvas de fusión, que permiten diferenciar los fragmentos del gen a analizar de otros productos inespecíficos. En este sentido, la elección de los cebadores adecuados y la optimización de las condiciones de la reacción pueden reducir la formación de dímeros de cebadores a bajos niveles de detección. Así, técnicas como la “Hot Start PCR” puede reducir la formación de dímeros de cebadores (Kellogg *et al.*, 1994).

La qPCR se puede dividir en cuatro fases, tal y como se observa en la Figura 2.9: fase lineal, exponencial, logarítmica lineal y fase de meseta (Tichopad *et al.*, 2003). Durante la fase lineal, la fluorescencia no se diferencia del ruido de fondo y es en esta fase cuando se calcula la fluorescencia base. Al inicio de la fase exponencial la fluorescencia alcanza un umbral, en el cual es significativamente superior al ruido de fondo.

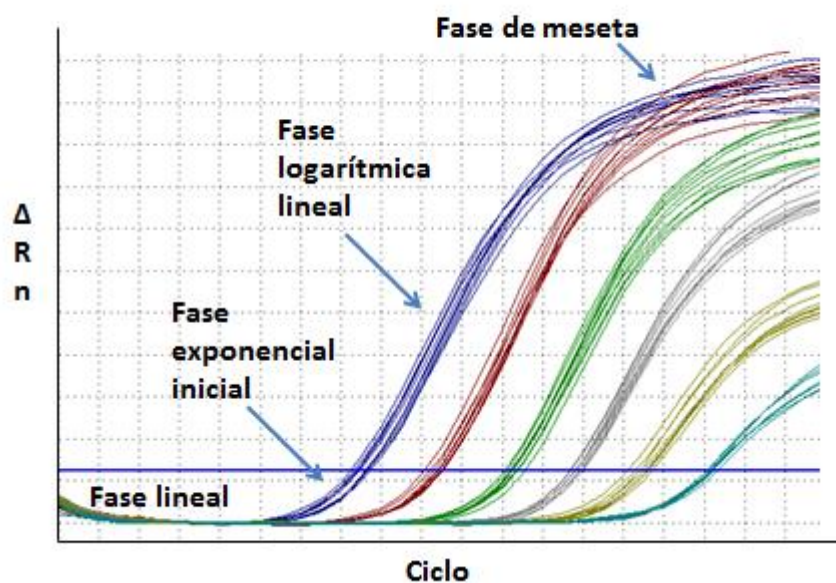


Figura 2.9. Fases de la PCR cuantitativa

Empleando cualquiera de estos sistemas el aumento en la emisión de fluorescencia puede ser detectado “a tiempo real” mientras la reacción tiene lugar. Un programa de ordenador calcula ΔR_n , a través de la siguiente ecuación $\Delta R_n = R_{n+1} - R_n$,

donde R_{n+} es la emisión de fluorescencia del producto de PCR en cada punto y R_{n-} es la fluorescencia de la línea base (Heid *et al.*, 1996; Gibson *et al.*, 1996). El programa construye una gráfica de puntos, empleando los datos de fluorescencia recogidos durante la amplificación. Los valores de ΔR_n se representan frente al ciclo de PCR (Figura 2.10). Durante los primeros ciclos de amplificación, los valores ΔR_n no exceden la fluorescencia base.

Se establece un umbral arbitrario, multiplicando por diez la desviación estándar de la línea base, establecida entre los ciclos 3 y 15. El ciclo umbral (C_t) se calcula determinando el punto en el cual la fluorescencia excede dicho umbral (Figura 2.10). Así, los valores de C_t descienden de forma lineal al incrementar la cantidad del gen a amplificar (Giulletti *et al.*, 2001).

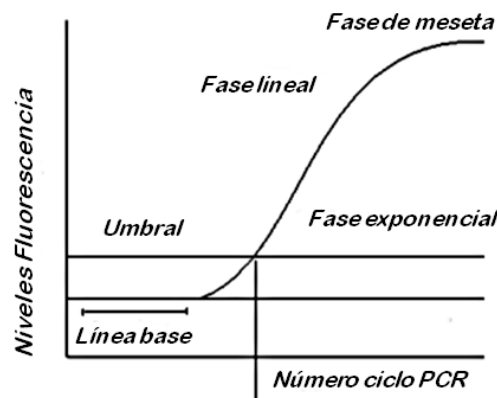


Figura 2.10. Fluorescencia emitida durante los ciclos de qPCR; nótese C_t

En lo que concierne a la expresión de un determinado gen, se puede realizar una cuantificación absoluta o relativa. A pesar de que con la primera se detecta el número de copias de ARN por célula, los estándares empleados son altamente inestables, limitando la utilización de este sistema a aquellos casos donde sea esencial una determinación absoluta. La cuantificación relativa, por su parte, resulta más adecuada para determinar los cambios en la expresión de un determinado gen bajo diversas condiciones (Freeman, 1999). Así, existen dos métodos fundamentales: el método de la curva estándar y el del umbral C_t (Giulletti *et al.*, 2001).

En el método de la curva estándar se emplea una muestra de concentración conocida para diseñar una curva estándar. Según Bustin (2000), pueden usarse como estándar ADN de un plásmido, o cualquier muestra de ADNc que exprese el gen a determinar. La concentración de esta muestra se puede medir por espectrofotometría a 260 nm y transformarse en el número de copias en función de los pesos moleculares del ARN o el ADN.

El método del umbral Ct, se basa en el empleo de fórmulas matemáticas para calcular la expresión relativa de un determinado gen en relación a un control, que puede ser una muestra no tratada. Así, la expresión de dicho gen, normalizada en base a un gen de referencia y relativa con respecto al control, viene dada por la siguiente fórmula:

$2^{-\Delta\Delta Ct}$, donde $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ (muestra)} - \Delta Ct \text{ (control)}$ y ΔCt es el Ct del gen a determinar menos el Ct del gen de referencia.

La ecuación representa, por tanto, la expresión normalizada del gen a determinar en relación a la expresión normalizada del control. Para poder emplear este método, la eficacia de amplificación de los genes a determinar y de los genes control debe ser aproximadamente la misma (Giulletti *et al.*, 2001). Las ventajas de este método son que no requiere estándares y se puede realizar en placas de 96 pocillos, siendo muy rápida y económica.

Como se mencionó anteriormente, para normalizar la expresión de un determinado gen hay que incluir en la qPCR genes de referencia, que la mayoría de células expresan en grandes cantidades y sirven como control en caso de que el gen a analizar no se exprese (Huggett *et al.*, 2005). Según Giulletti *et al.* (2001), un gen de referencia “ideal” debería expresarse a un nivel constante en los diferentes tejidos del organismo y no verse afectado por el tratamiento experimental.

Los genes de referencia más empleados son la β -actina, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) y ARN ribosómico 18S. El gen de la β -actina codifica una proteína del citoesqueleto, que todas las células producen; la GAPDH es una enzima glucolítica, presente en la mayoría de tipos celulares. Mientras que el gen β -actina ha demostrado dar buenos resultados en la mayoría de estudios, el GAPDH parece ser más susceptible a las condiciones de cada experimento (Al-Bader y Al-Sarraf, 2005). Estos autores concluyeron que el 18S, RPL-19, BGLU, CY y HH4 son también genes estables

para la normalización. Según VanGuilder *et al.* (2008) el acierto en la elección de los genes de referencia mejora considerablemente la eficacia de la reacción.

2.2.1.5. Comparación de las distintas técnicas

A diferencia de lo que ocurre en humanos y roedores, en los rumiantes domésticos resulta difícil estandarizar la detección de citoquinas a nivel de secreción empleando técnicas de inmunoensayo como el ELISA, ELISPOT o la citometría de flujo, debido a la escasez de anticuerpos comerciales específicos. Por esta razón, la mayoría de estudios actuales se enfocan a la detección de las citoquinas a nivel de expresión mediante el empleo de técnicas moleculares como la RT-PCR (Keefe *et al.*, 1997; Yakobson *et al.*, 2000).

Una de las primeras enfermedades en las que se empleó la detección de citoquinas para su diagnóstico fue la tuberculosis bovina, en la que la respuesta inmunitaria es fundamentalmente de tipo celular. Desde que Rothel *et al.* (1990) pusieran a punto un ELISA tipo sándwich para la detección del IFN- γ , han sido numerosos los estudios encaminados al desarrollo y perfeccionamiento de nuevas técnicas para su detección.

Por tanto, la elección de la técnica está determinada por la citoquina a analizar. En este sentido, Favre *et al.* (1997) realizaron una comparación de los diferentes métodos que evalúan la secreción (ELISA), producción (ELISPOT) y expresión (RT-PCR) de las distintas citoquinas empleando linfocitos de ratón estimulados con anticuerpos anti-CD3. En el caso del IFN- γ y la IL-4, se observó una estrecha correlación entre los valores obtenidos por los tres métodos al emplear sobrenadantes de cultivos celulares. Por el contrario, al evaluar la producción de TNF- α , se observaron amplias discrepancias entre los tres métodos empleados. De este trabajo se concluye que la comparación de las distintas técnicas ha de realizarse con precisión ya que no todas las citoquinas presentan los mismos patrones de transcripción, expresión y secreción.

Mientras que Mo *et al.* (1995) en modelos animales, observaron que el ELISA era el método menos sensible para la detección de IL-4, Doherty *et al.* (2005) en modelos humanos comprobaron que la RT-PCR era el método más adecuado.

Asimismo, Díaz y Mateu (2005) en cerdos, estudiaron la evolución, desde el nacimiento hasta los 6 meses de edad, de las citoquinas IFN- γ , IL-10 e IL-4, comprobando que los resultados del ELISA y el ELISPOT no siempre son comparables.

Mena *et al.* (2002) emplearon ELISA, ELISPOT y RT-PCR para estudiar la respuesta a la vacunación frente al herpesvirus bovino I en vacuno, observando que si bien en el caso del IFN- γ existe una correlación entre las tres técnicas, no sucede lo mismo con la IL-4. Esto se debe a que, mientras que el IFN- γ es relativamente abundante y fácilmente detectable, la IL-4 está menos presente de modo que su determinación en sobrenadantes celulares resulta más complicada.

Más recientemente, Singh *et al.* (2011) emplearon la RT-PCR y el ELISA para cuantificar la expresión de diversas citoquinas por parte de macrófagos alveolares bovinos estimulados con dos cepas de *Mannheimia haemolytica*; mientras que con la técnica ELISA se detectó un ascenso de los niveles de TNF- α e IL-10 en los sobrenadantes de los cultivos de macrófagos incubados con la cepa deficitaria en leucotoxina, mediante RT-PCR no se observaron aumentos significativos en ninguna de las citoquinas estudiadas.







3. CAPÍTULO I. RESPUESTA CELULAR SUBCUTÁNEA EN EL DORSO



3. CAPÍTULO I. RESPUESTA CELULAR FRENTE A LAS FASES SUBCUTÁNEAS DE *Hypoderma* sp.

3.1. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Las larvas de *Hypoderma* provocan importantes pérdidas económicas y aumentan la susceptibilidad del ganado vacuno frente a las enfermedades (Drummond, 1987). Aunque Gingrich (1980) señaló que los mecanismos inmunitarios son especialmente importantes en fases tempranas del desarrollo larvario, Pruett y Kunz (1996) evidenciaron que la destrucción larvaria ocurre también de forma intensa en los últimos estadios de desarrollo, coincidiendo con la presencia de las larvas en el dorso.

Por otra parte, la inmunohistoquímica se ha empleado de forma habitual para estudiar la respuesta inmunitaria local desencadenada por diversos parásitos en ganado vacuno, tanto para la caracterización de las poblaciones celulares como para establecer el patrón de producción de diversas citoquinas (Sakamoto y Cabrera, 2003; Milnes *et al.*, 2007; Golbar *et al.*, 2013; Canton *et al.*, 2014; Fuertes *et al.*, 2015).

En el caso de la hipodermosis, mientras que son varios los estudios que caracterizan la respuesta sistémica y local en la fase de penetración de las larvas 1 (López *et al.*, 2005; Dacal *et al.*, 2009, 2011; Panadero *et al.*, 2013), se desconocen las poblaciones celulares y citoquinas implicadas en la reacción frente a larvas 2 y 3 del parásito en su localización en el dorso.

Teniendo en cuenta estas consideraciones, en este apartado planteamos los siguientes **OBJETIVOS**:

1º.- Definir y clasificar mediante histopatología las lesiones macroscópicas causadas por las larvas subcutáneas de *Hypoderma*.

2º.- Caracterizar mediante inmunohistoquímica las poblaciones celulares implicadas en la reacción frente a las larvas subcutáneas, incluyendo la respuesta a macrófagos, linfocitos T, linfocitos B y células plasmáticas productoras de IgG.

3°.- Determinar mediante inmunohistoquímica la producción de IFN- γ en los distintos tipos lesionales causados por las larvas subcutáneas.

3.2. MATERIAL Y MÉTODOS

3.2.1. TOMA DE MUESTRAS

Para la realización de este estudio se recogió la piel de tres vacas que presentaban un gran número de nódulos larvarios de *Hypoderma* tras su sacrificio en un matadero local de la provincia de Lugo (Novafriga). La cara externa de las pieles se examinó cuidadosamente para descartar la presencia de otros ectoparásitos (ácaros de la sarna, garrapatas, pulgas, etc.); la cara interna se inspeccionó igualmente y se realizó el recuento de los nódulos larvarios en distintas fases de desarrollo (Foto 1).

La primera piel (vaca 1) fue recogida en marzo de 2012 y presentó 16 nódulos viables (larvas vivas en su interior) y 13 no viables (sin larvas o con larvas muertas). La segunda (vaca 2), recogida en el mes de abril de ese mismo año, presentó 4 nódulos viables y 38 no viables. Por último, la tercera piel recogida en mayo (vaca 3), presentó 19 nódulos no viables.



Figura 3.1. Imagen de la parte interna de la piel de una vaca con larvas subcutáneas de *Hypoderma*.

3.2.2. ANÁLISIS HISTOPATOLÓGICO

Para el estudio histopatológico e inmunohistoquímico se tomaron 45 muestras cutáneas (15, 31 y 9, de las vacas 1, 2 y 3, respectivamente), incluyéndose 10 nódulos con larva viable, 20 con larva muerta y 15 cicatrices. Las muestras se fijaron en formaldehído al 10% y tras su tallado, se introdujeron en un procesador automático de tejidos, donde fueron deshidratadas en gradientes crecientes de etanol siguiendo el protocolo descrito a continuación:

1. Lavado en agua corriente durante una hora y media para retirar el formaldehído
2. Etanol 50° durante una hora y media
3. Etanol 70° durante una hora y media
4. Etanol 96° I durante una hora y media
5. Etanol 96° II durante una hora y media
6. Etanol 100° I durante una hora y media
7. Etanol 100° durante una hora y media

A continuación, las muestras se pasaron a xilol y se incluyeron en parafina líquida (51-53°C).

Los cortes histológicos se realizaron con un micrótomo de 4 micras de grosor y seguidamente, se pasaron a un baño histológico (37°C) hasta que las muestras estuvieron completamente extendidas y se recogieron con un portaobjetos. Los cortes histológicos se dejaron secar en una estufa a 37°C durante 24 horas, hasta que estuvieron completamente adheridas al portaobjetos.

La tinción empleada en el estudio histopatológico fue la hematoxilina-eosina (HE), siguiendo el protocolo descrito en la Tabla 3.1. El sellado de las muestras se realizó aplicando una gota de medio de montaje rápido (DPX) sobre el cubreobjetos y colocando cuidadosamente sobre él, el portaobjetos con la muestra. Finalmente, se eliminaron las burbujas de aire que pudieron quedar y se dejaron secar los cortes durante 24 horas antes de examinarlos al microscopio. El recuento celular se realizó a 400 aumentos.

Tabla 3.1. Técnica de tinción Hematoxilina-eosina

<p>Desparafinado de las muestras</p> <ul style="list-style-type: none"> • Xilol I durante 10 minutos • Xilol II durante 10 minutos
<p>Hidratación de las muestras</p> <ul style="list-style-type: none"> • Etanol 100° I durante 5 minutos • Etanol 100° II durante 5 minutos • Etanol 96° I durante 5 minutos • Etanol 96° II durante 5 minutos • Etanol 70° durante 5 minutos • Etanol 50° durante 5 minutos • Varios lavados con agua corriente
<p>Tinción de las muestras</p> <ul style="list-style-type: none"> • Hematoxilina durante 5 minutos • Varios lavados con agua corriente
<p>Contraste</p> <ul style="list-style-type: none"> • Eosina durante 3 minutos • Varios lavados con agua corriente
<p>Deshidratación de las muestras</p> <ul style="list-style-type: none"> • Etanol 50° durante 1 minuto • Etanol 70° durante 1 minuto • Etanol 96° I durante 1 minuto • Etanol 96° II durante 1 minuto • Etanol 100° I durante 3 minutos • Etanol 100° II durante 3 minutos • Xilol I durante 5 minutos • Xilol II durante 5 minutos

3.2.3. ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO

Para el estudio inmunohistoquímico, los cortes de 4 μm se colocaron en portas pretratados con poli-L-lisina. Las muestras se desparafinaron con tres baños en xilol de 10 minutos cada uno y se rehidrataron en dos baños de 5 minutos en etanol 100°. El procedimiento empleado fue el siguiente:

- **Inhibición de la peroxidasa endógena;** las muestras se incubaron con peróxido de hidrógeno al 3% durante 30 min en oscuridad a temperatura ambiente.
- Lavado en PBS pH 7,4.
- **Desenmascaramiento antigénico,** empleando calor y métodos enzimáticos, en función del anticuerpo primario (Tabla 1).
- Doble lavado con PBS (para frenar la digestión enzimática)
- **Anticuerpo primario,** las muestras se incubaron con el anticuerpo primario diluido en PBS toda la noche a 4°C en cámara húmeda (Tabla 3.2).
- Doble lavado con PBS
- **Solución EnVision+/HRP** (Dako) durante 40 minutos a temperatura ambiente
- Doble lavado con PBS
- **Revelado:** la reacción se realizó con 3,3-diaminobenzidina (DAB, Sigma-Aldrich) como sustrato para la peroxidasa
- **Frenado** del revelado: lavado en agua corriente durante 10 minutos
- **Contratinción** con hematoxilina durante 30 segundos.
- Lavado en agua corriente
- Deshidratación: en baños de etanol
- **Montado** de las preparaciones: aplicando una gota de DPX al cubreobjetos y dejándolo caer suavemente sobre el portaobjetos

Tabla 3.2. Anticuerpos primarios empleados en inmunohistoquímica

Tipo celular	Especificidad	Clon	Origen	Pretratamiento	Dilución	Fuente
Macrófagos	Calprotectina	MAC 387	Ratón	Tripsina	1:75	Dako
	CD68	PG-M1	Ratón	Tripsina	1:100	Dako
	Lisozima	Policlonal	Conejo	Tripsina	1:1000	Dako
Linfocitos B	CD79	JCB117	Ratón	Microondas	1:25	Dako
Linfocitos T	CD3	Policlonal	Conejo	Olla a presión	1:200	Sigma
Células plasmáticas	IgG Lambda Light Chains	Policlonal	Conejo	Triton X-100	1:6000	Dako
Células IFN- γ +	IFN- γ (bovino)	CC330	Ratón	Tampón pH 6	1:250	Serotec

Las muestras se examinaron al microscopio a 400 aumentos para observar las distintas capas dérmicas: epidermis, dermis superficial y profunda e hipodermis.

Las células marcadas integrantes de la lesión fueron evaluadas y se estableció una clasificación cualitativa del número de células positivas, desde ninguna (0) a muy numerosas (+++).

En el caso de las células productoras de IFN- γ , se realizó el recuento de 10 campos distribuidos al azar por toda la superficie de la muestra. En lo que respecta a los análisis estadísticos, se efectuó una ANOVA multifactorial con el programa estadístico R versión 3.1.1. Los resultados se presentan como la media de las células contabilizadas en los distintos campos.

3.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.3.1. LESIONES MACROSCÓPICAS

Macroscópicamente se observaron en la cara externa de la piel orificios respiratorios y cicatrices de 4 y 2 mm de diámetro, respectivamente (Figura 3.2a). En la cara interna se encontraron nódulos larvarios en diferentes fases de desarrollo: nódulos viables (n=20) compuestos por la larva y material necrótico, delimitados por una capa de tejido conectivo (Fig. 3.2b); nódulos no viables (n=40), con larva oscura, aplastada y en apariencia deshidratada en su interior (Fig. 3.2c). Las 30 muestras restantes presentaban tejido cicatricial con restos larvarios visibles.

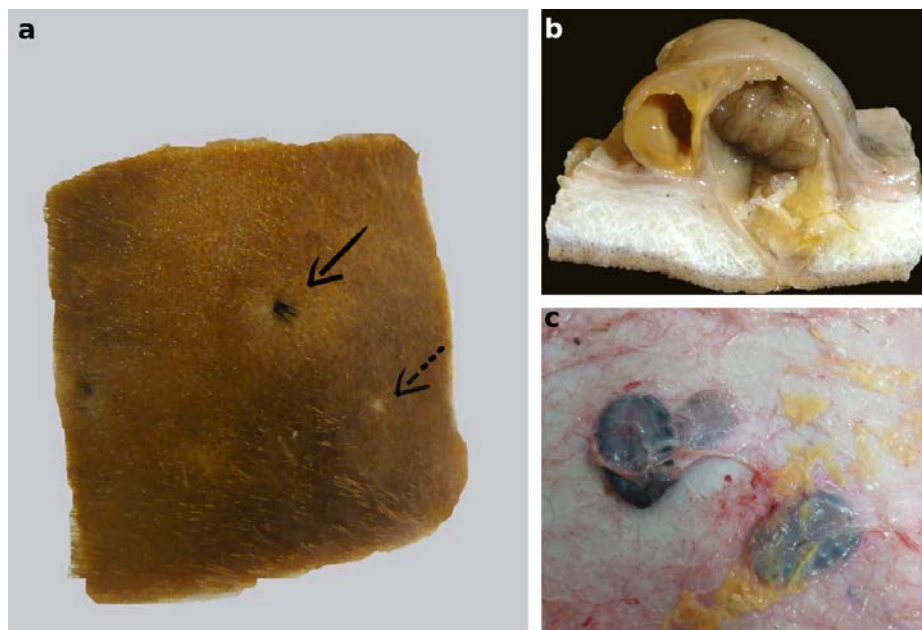


Figura 3.2. (a) Cara externa de la piel de una vaca afectada por *Hypoderma* mostrando orificios respiratorios (—) y cicatrices (----). (b) Larva viable, rodeada por material necrótico, dentro de una cavidad fibrosa. (c) Larva no viable en la cara interna de la piel

En las lesiones causadas por las larvas de tercer estadio de *Przhevalskiana silenus* en cabras se han encontrado abscesos piogranulomatosos alrededor de algunas L3 vivas, incluso después de su emergencia (Oryan y Bahrami, 2012); en nuestro estudio no se observó nada similar. La presencia de material purulento en las lesiones puede ser debido a la contaminación bacteriana secundaria a través del orificio de la larva (Oryan y Bahrami, 2012), aunque en nuestro caso no se observó.

3.3.2. HISTOPATOLOGÍA

El estudio puso de manifiesto la existencia de diferentes lesiones microscópicas relacionadas con el estado y la viabilidad larvaria durante la fase localizada en el dorso. En general, las lesiones se caracterizaron por la existencia de una dermatitis crónica proliferativa en la dermis interna, con variaciones en las poblaciones celulares presentes en el infiltrado, en relación a los diferentes tipos de lesión. En todas las muestras examinadas la dermis superficial mostró un infiltrado inflamatorio perivascular de medio a moderado, compuesto principalmente por linfocitos y células plasmáticas y en menor medida, por eosinófilos.

En la dermis profunda las lesiones fueron variables y se clasificaron en tres grupos distintos en función de la presencia y el estado de preservación de la larva; las características del infiltrado inflamatorio y las células predominantes en cada lesión fueron:

Durante la fase de penetración asociada a larvas de primer estadio, otros autores (Lello y Rosis, 2003; López *et al.*, 2005; Oryan y Bahrami, 2012) evidenciaron la presencia de abundantes neutrófilos y eosinófilos en la inflamación. En nuestro estudio, sin embargo, los neutrófilos fueron escasos, siendo la inflamación predominantemente de tipo mononuclear. Apenas se observaron eosinófilos, hecho que contrasta con el elevado número de este tipo de células observado por Nelson y Weintraub (1972) y López *et al.*, (2005) en el punto de entrada de la larva y por Boulard (1975) y Arru *et al.* (1985) en la fase de reposo en la submucosa esofágica. Esta respuesta es resultado de las diferencias en la actividad larvaria en la piel.

Durante la fase de penetración las larvas de primer estadio degradan el tejido subcutáneo gracias a las enzimas colagenolíticas secretadas por las glándulas salivares e intestinales (Madel y Nahif, 1971; Tassi *et al.*, 1989), causando necrosis y atrayendo neutrófilos. En la fase del dorso, después de la migración, las larvas de tercer estadio se localizan en nódulos subcutáneos, donde permanecen entre cuatro y seis semanas (Beesley, 1974).

Aunque se observó necrosis asociada a la presencia de larvas, ésta fue moderada y acompañada siempre de fibrina (lesiones tipo 1) y sin infiltrado neutrofílico. A este respecto, es probable que, en el momento del muestreo, extensas áreas de necrosis asociadas a larvas de segundo y tercer estadio hayan desaparecido. Asimismo, se debe considerar la posibilidad de que los distintos estadios larvarios secreten sustancias con distinta actividad quimiotáctica para eosinófilos y neutrófilos.

Lesiones tipo 1 (18 muestras). En el centro de la lesión, contenían la larva viva o muerta recientemente. En todas ellas se observó una capa de quitina bien preservada. En aquellas muestras con larva viable se observó tejido muscular esquelético, anillos traqueales y células intestinales. En relación a la estructura de la larva, la ausencia de piezas bucales fue descrita por Boulard (1969); en la fase del dorso, las larvas son sedentarias y se alimentan de material circundante; por el contrario, en las muestras con

larva muerta se reconoció un material amorfo eosinofílico rodeado por la cutícula (Fig. 3.3a). La larva apareció rodeada de por varias capas de fibrina y material necrótico (Fig. 3.3a). Igualmente, se evidenció una capa de epitelio escamoso recubriendo la cara interna del orificio respiratorio. Estas lesiones son similares a los clásicos nódulos larvarios caracterizados por la presencia de la larva 3 intacta, un infiltrado inflamatorio y un orificio central recubierto por un epitelio escamoso formado a partir de la proliferación de la epidermis circundante de la cara interna del orificio, similar al descrito por Marcato (1990) y consistente con el poro respiratorio de la larva (Hadwen y Bruce, 1916).

Externamente se observó un infiltrado celular compuesto fundamentalmente por células plasmáticas, con una cantidad moderada de macrófagos y linfocitos y eosinófilos escasos, infiltrando el tejido conectivo circundante. La reacción inflamatoria se caracterizó, por tanto, por el predominio de células plasmáticas, coincidiendo con el incremento de anticuerpos séricos, simultáneo a la aparición de los nódulos en el dorso, descrito por Panadero *et al.* (2013).

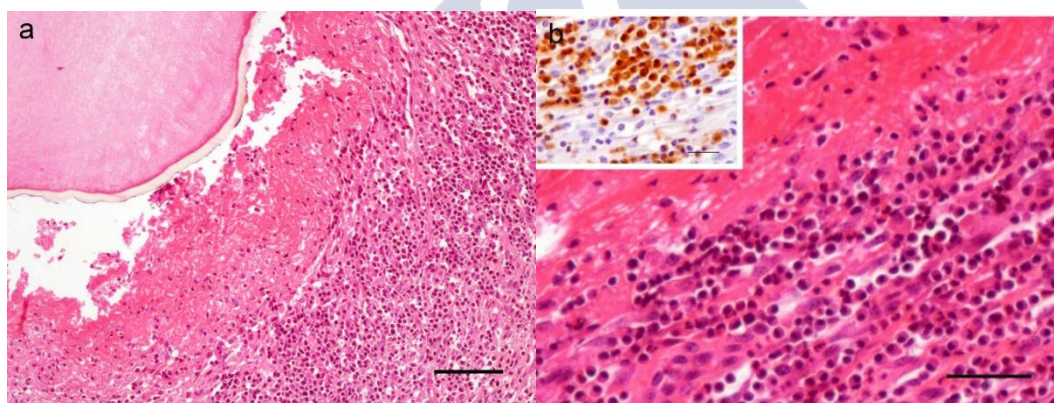


Figura 3.3. Lesión tipo 1. (a) Larva no viable (nótese el material eosinofílico amorfo dentro de la cutícula bien preservada) en relación al infiltrado celular de la dermis con fibrina y restos necróticos. HE. Bar 100 μ m (b) Detalle del infiltrado inflamatorio en la dermis, formado fundamentalmente por células plasmáticas. HE. Bar 50 μ m. Marcado inmunohistoquímico de las células plasmáticas IgG. HE. Bar 25 μ m.

Lesiones tipo 2 (12 muestras). En todas ellas, se observaron larvas muertas y sin cutícula. La morfología de la larva varió considerablemente; mientras que en algunas lesiones mantuvo su forma, en otras se observaron solamente restos de cutícula y espículas entre material necrótico. El infiltrado inflamatorio contenía principalmente macrófagos de citoplasma eosinofílico compatibles con células epitelioides, así como

células gigantes multinucleadas, células de cuerpo extraño y tipo Langhans, formando un granuloma bien definido (Fig. 3.4 y 3.5). De la misma manera, se observó una capa formada por un número variable de linfocitos, esporádicamente agrupados, rodeando el infiltrado. Por otra parte, se detectaron focos ocasionales de mineralización en grupos de células epitelioides necróticas. En la periferia se observó una cápsula de tejido conectivo delimitando toda la lesión. En algunas muestras no se encontraron restos de larva.

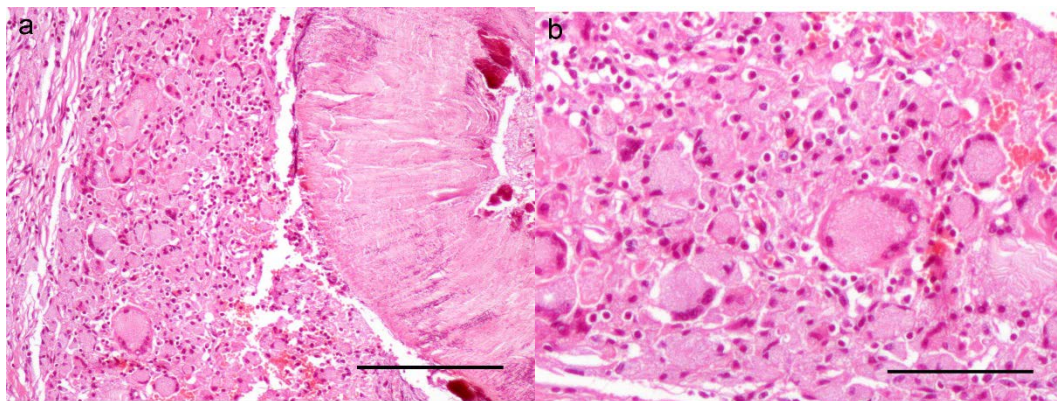


Figura 3.4. Lesión tipo 2. (a) Lesiones granulomatosas donde los restos larvarios, sin cutícula visible, están presentes en el centro y rodeados por un infiltrado inflamatorio, externamente delimitado por tejido fibroso. HE. Bar 200 μ m. (b) Detalle del infiltrado granulomatoso con presencia de células epitelioides y multinucleadas gigantes. HE. Bar 100 μ m.

Este tipo de lesión se asoció a la presencia de larva muerta y sus restos. El hecho de que se produzca un incremento intenso del número de macrófagos entre los tipos lesionales 1 y 2, coincidiendo con la desaparición de la cutícula larvaria, sugiere que ésta podría tener un papel importante en la respuesta inflamatoria, desencadenando la proliferación de células plasmáticas en lugar de macrófagos. Tras la desaparición de la cutícula (lesiones tipo 2), en el infiltrado inflamatorio predominan los macrófagos, rodeando los restos de larva muerta y cutícula que son difíciles de eliminar (Ginn *et al.*, 2007). De acuerdo con estudios previos (Pruett y Kunz, 1996), la resistencia adquirida por el hospedador provoca una considerable mortalidad larvaria, que tiene lugar antes de su llegada al dorso. En este aspecto, el predominio de la respuesta Th2, caracterizada por niveles elevados de IgG1 e IL-4 en las últimas fases de la infestación, podría ser responsable de la destrucción larvaria, tal y como señalaron Vázquez *et al.* (2012).

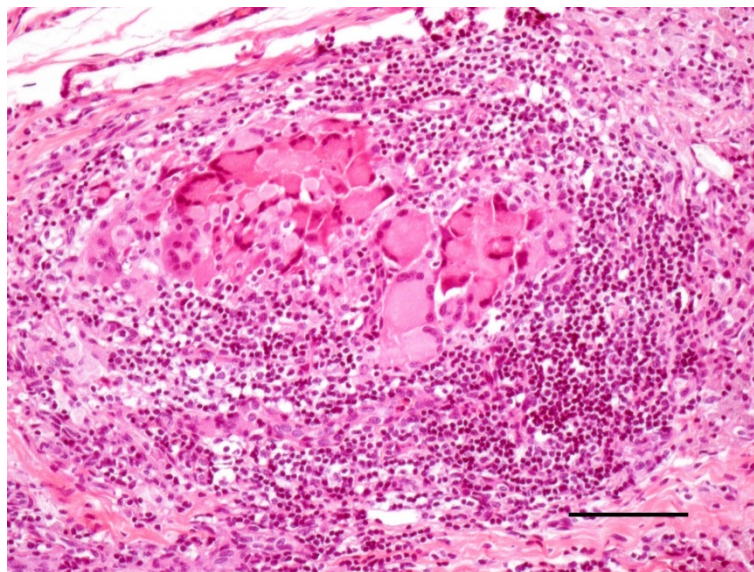


Figura 3.5. Lesión tipo 2. Granuloma caracterizado por un área central de células multinucleadas gigantes, rodeada por linfocitos formando agregados y demarcada por una cápsula fibrosa. HE. Bar 100 μ m

Lesiones tipo 3 (15 muestras). Las lesiones tipo 3, por su parte, están formadas por tejido de granulación a partir del cual se formará la cicatriz tras la salida de la larva, de acuerdo a la descripción de Marcato (1990). Las únicas lesiones observadas fueron infiltrados mononucleares perivasculares y tejido de granulación compuesto por fibroblastos y neovasos. Además, se detectaron agregados focales de linfocitos con algunos macrófagos (Figura 3.6).

En las lesiones tipo 2 y 3, el poro larvario no fue visible. Esto puede ser debido a que tras la salida de la larva 3, el orificio se cierra con tejido cicatricial, aunque en ciertas ocasiones los restos del parásito pueden retrasar el proceso. En este sentido, Rietschel (1979) describió un patrón de cicatrización similar en la evolución de los nódulos de *Oestromya leporine*: con fibroblastos rodeando el orificio producido por la larva y exudados y restos del parásito en su interior. La epidermis prolifera entre ambos tejidos y el contenido es expulsado al exterior gracias a la presión muscular y al crecimiento del nuevo tejido.

La reducción progresiva de células plasmáticas en los tipos lesionales 2 y 3, junto con el incremento de macrófagos y linfocitos T, pueden estar relacionados con la exposición a los diferentes antígenos liberados tras la muerte de la larva o con la ruptura de la cutícula o su salida de la dermis.

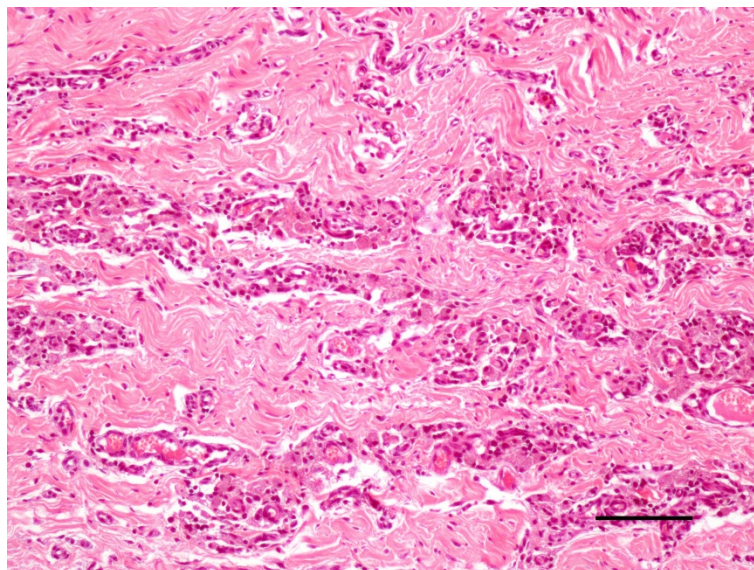


Figura 3.6. Lesión tipo 3. Tejido de granulación con abundante colágeno y pequeños agregados inflamatorios, con predominio de linfocitos y macrófagos. HE. Bar 100 μ m.

Considerando la correlación entre lesiones macroscópicas y la histopatología, el 100% de larvas viables se consideraron como lesiones de tipo 1. Los 20 nódulos examinados que contenían larvas no viables se clasificaron como lesiones de tipo 2. Finalmente, el 100% de las lesiones de cicatrización correspondieron lesiones de tipo 3.

3.3.3. INMUNOHISTOQUÍMICA

3.3.3.1. Linfocitos B y células IgG⁺

En las lesiones tipo 1 se observó un gran número de linfocitos CD79⁺ (alrededor del 60% de ellos formando un infiltrado) y células productoras de IgG. En el resto de lesiones fueron escasos.

La reducción de ambas poblaciones en los tipos lesionales 2 y 3 podría explicar el descenso de los valores de anticuerpos séricos observados por Baron y Colwell (1991) cuando la larva abandona el dorso y tiene lugar la cicatrización del tejido. Estos hallazgos podrían sugerir que el infiltrado inflamatorio local podría jugar un papel importante en la producción de anticuerpos detectados en suero. Los linfonodos regionales no fueron analizados pero, probablemente, contribuyan también a esta elevación.

3.3.3.2. Macrófagos

Mientras que las células plasmáticas y los linfocitos B decrecieron en las lesiones tipo 2 y 3, se observó un incremento del número de macrófagos hasta formar el granuloma. Su función está relacionada con la fagocitosis (Fukiwara y Kobayashi, 2005) de los restos larvarios y la formación de granulomas en presencia de sustancias difícilmente degradables (Agostini y Semenzato, 2003).

Con respecto a los macrófagos, en los tipos lesionales 1 y 2 reaccionaron con los anticuerpos frente a lisozima y el marcador CD68, una glucoproteína asociada a lisosomas y con función fagocítica (Ackermann *et al.*, 1994; Ramprasad *et al.*, 1996). En el tipo 1, se detectaron células teñidas aisladas entre el infiltrado inflamatorio, especialmente en las proximidades de las zonas necróticas alrededor de la larva. En las lesiones tipo 2, todas las células epitelioides y gigantes integrantes del granuloma fueron positivas a inmunohistoquímica con intensidad variable. La inmunoreacción positiva a ambos anticuerpos sugiere que los macrófagos presentes en las lesiones mostrarán un estado de activación relacionado con el aumento de lisosomas (Valheim *et al.*, 2004).

Por su parte, los CD68⁺ fueron escasos en las lesiones tipo 3, así como en la dermis superficial y profunda de las áreas no relacionadas con la lesión.

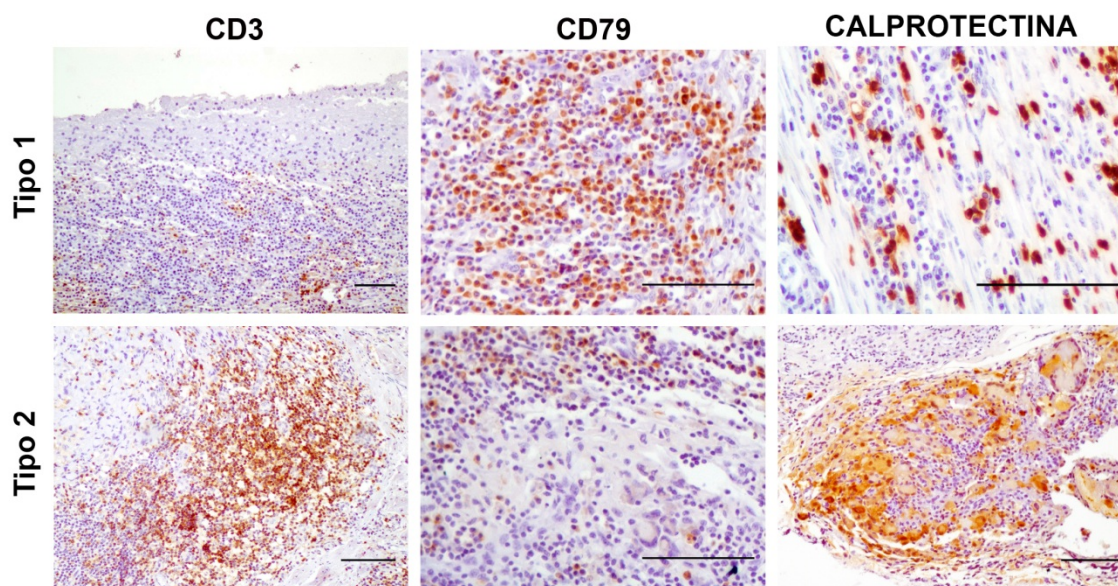


Figura 3.7. Comparación entre los tipos lesionales 1 y 2 en inmunohistoquímica (color marrón) para CD3 (linfocitos T), CD79 (linfocitos B) y calprotectina (macrófagos recién reclutados) en el infiltrado inflamatorio. IHC. Bar 200 μ m

En cuanto a los MAC387⁺, se observaron formando parte del infiltrado inflamatorio, rodeando las áreas necróticas alrededor de la larva en las lesiones tipo 1. Los macrófagos marcados con el anticuerpo MAC387 son células recién reclutadas, pues pierden su expresión en el curso de la diferenciación, tal y como comprobaron otros autores (Kipar *et al.*, 2003; Soulas *et al.*, 2011). Igualmente, el epitelio que cubría el orificio del nódulo fue positivo a este anticuerpo, mientras que el resto del epitelio resultó negativo (Figura 3.7).

En las lesiones tipo 2, la mayoría de los macrófagos fueron positivos, con intensidad variable de acuerdo con su localización en el granuloma. Mientras que las células epitelioides del centro del granuloma fueron positivas, el número de células marcadas fue menor en la periferia. Así, en los granulomas formados, los macrófagos de la zona central en torno a los restos del parásito se tiñeron con gran intensidad; los de la periferia fueron negativos. Este hecho sugiere que los macrófagos del centro del granuloma son reemplazados continuamente, mientras que aquellos que han fagocitado se desplazan a la periferia. En las lesiones tipo 3 apenas se detectaron células MAC387⁺, que tampoco aparecen en el tejido dérmico normal.

Por otra parte, uno de los hallazgos más sorprendentes de este estudio fue la reacción del epitelio escamoso del poro al anticuerpo MAC387, en contraste con el epitelio normal. En este sentido, Brandtzaeg *et al.* (1992) concluyeron que células epiteliales “reactivas” pueden expresar niveles altos de calprotectina, proteína que reconoce el anticuerpo MAC387. Esta molécula ha demostrado tener un papel importante en la infección, inflamación y cicatrización (Dhas *et al.*, 2012), y su expresión en estas células sugiere que pueden jugar un papel fundamental en la respuesta local frente a las larvas de *Hypoderma*. Concretamente, la producción de calprotectina se ha relacionado con una disminución de la migración de neutrófilos y de la liberación de citoquinas (Averill *et al.*, 2012). Este hecho podría explicar a su vez la ausencia de neutrófilos en este tipo de lesión, en contraste con las lesiones causadas por la penetración de larva 1.

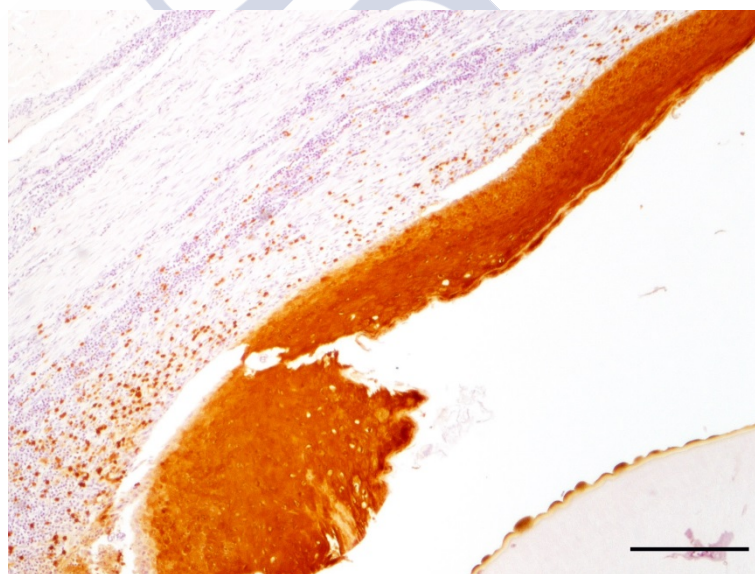


Figura 3.8. Tinción inmunohistoquímica (color marrón) de las células epiteliales reactivas en el orificio de la larva en las lesiones tipo 1 y 2. Nótese la dispersión de células positivas (macrófagos recién reclutados) entre el infiltrado inflamatorio de la dermis. Calprotectina. IHC. Bar 100 μ m

3.3.3.3. Linfocitos T

Mientras que apenas se observaron células de este tipo en las lesiones tipo 1, los agregados de las lesiones tipo 2 estaban compuestos fundamentalmente por linfocitos

CD3⁺. Por su parte, en las lesiones tipo 3, éstos se observaron dispersos. Así, los linfocitos T estuvieron muy presentes en los tipos lesionales 2 y 3, siempre en relación con los macrófagos. Este hecho sugiere que, una vez que la larva muere y después del procesado del antígeno, los macrófagos podrían actuar como presentadores de antígenos (Fukiwara y Kobayashi, 2005), induciendo una respuesta celular específica frente *Hypoderma*. Igualmente, López *et al.* (2005) constataron la presencia de linfocitos T en el infiltrado inflamatorio asociado a la penetración de las larvas.

Tabla 3.3. Resultados del número de células marcadas en los tres tipos lesionales descritos

Tipo	CD3 ⁺	CD79 ⁺	CD68 ⁺	MAC387 ⁺	Lysozyme	IgG ⁺
1	+	+++	+	++	++	++
2	++/+++	+	+++	+++	++	0
3	+	+	+	+	+	0

Nulo (0); medio (+); moderado (++); intenso (+++)

3.3.3.4. Células productoras de IFN- γ

Tal y como se puede apreciar en la Figura 3.9, el mayor número de células productoras de IFN- γ correspondió a las lesiones de tipo 3, seguidas de las tipo 1 y 2, respectivamente. Estas diferencias, sin embargo, no fueron significativas ($p > 0,05$).

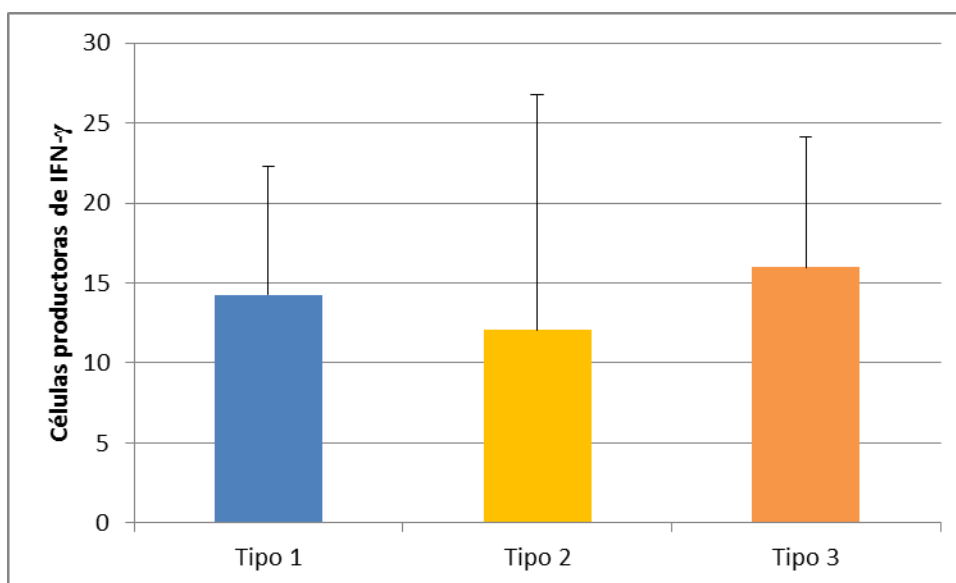


Figura 3.9. Células productoras de IFN- γ en los distintos tipos lesionales descritos en la fase subcutánea del dorso de *Hypoderma*

Dacal *et al.* (2009) también estudiaron la dinámica de esta citoquina en el punto de entrada de las larvas de *Hypoderma*, observando un incremento de su producción a las 6 h.p.i., tanto en animales primoinfectados como reinfestados. Según estos resultados, el aumento en la producción de IFN- γ a nivel cutáneo, tanto en el punto de entrada como en la fase de dorso, pondría de relieve el papel de esta citoquina como activador de macrófagos e inductor de la migración linfocitaria que intervienen en la respuesta contra el parásito.





4. CAPÍTULO II. USO DEL ELISPOT PARA LA DETECCIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE IFN- γ EN LA HIPODERMOSIS BOVINA



4. CAPÍTULO II. USO DEL ELISPOT PARA LA DETECCIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE IFN- γ EN LA HIPODERMOSIS BOVINA

4.1. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS ESPECÍFICOS

A pesar de que la respuesta humoral en la hipodermosis ha sido ampliamente estudiada (Panadero *et al.*, 2001; Colwell *et al.*, 2003), se ha comprobado que no existe relación directa entre los niveles de inmunoglobulinas séricas y el grado de protección mostrado por los animales (Pruett y Barrett, 1985; Panadero, 1996). Por esta razón, se sospecha que la respuesta celular desempeña un papel muy importante en la respuesta protectora frente a esta parasitosis.

Dentro de la respuesta celular Th1 destaca el IFN- γ , que es una citoquina producida por linfocitos T y células NK (Romagnani, 1997). Posee actividad antiviral y es reguladora del crecimiento celular. Asimismo, el IFN- γ es el principal activador de los macrófagos (Boehm *et al.*, 1997), juega un papel importante en el crecimiento y diferenciación de los linfocitos citotóxicos, activa las células NK y actúa como factor de maduración de los linfocitos B.

El ELISPOT, cuyas bases son similares a las del ELISA convencional, permite la detección de citoquinas como el IFN- γ , haciendo posible la cuantificación de células secretoras de dicha citoquina a nivel individual. Por otra parte, los patrones de liberación de citoquinas permiten caracterizar la función de las células en respuesta a la estimulación con diversos antígenos. Por esta razón, el ELISPOT se ha convertido en una potente herramienta para estudiar la respuesta inmunitaria en distintas enfermedades. Al igual que el ELISA, es una técnica relativamente sencilla, caracterizada por su alta sensibilidad y reproducibilidad.

Teniendo en cuenta estas consideraciones, planteamos en este apartado los siguientes **OBJETIVOS**:

1º.- Estudiar el efecto de las hipodermis A, B y C, así como del antígeno bruto (ET) sobre la síntesis y secreción de IFN- γ .

2º.- Comparar los patrones de secreción de IFN- γ de los linfocitos de bovinos infestados y no infestados por *Hypoderma*.

3º.- Determinar la posible relación entre el número de CS-IFN- γ detectadas mediante ELISPOT y los niveles de esta citoquina hallados mediante ELISA sándwich en el sobrenadante de cultivos celulares.

4.2. MATERIAL Y MÉTODOS

4.2.1. ANIMALES Y TOMA DE MUESTRAS

Animales infestados: Para la puesta a punto del ELISPOT se tomaron muestras de sangre de 4 vacas adultas del Hospital Clínico Veterinario Rof Codina que presentaban nódulos larvarios de *Hypoderma* en el dorso en el momento del muestreo. Las muestras se obtuvieron de la vena caudal empleando tubos Vacutainer® de 10 ml con heparina de litio, que se invirtieron varias veces para asegurar que la sangre se mezclase completamente con el anticoagulante. Así, se extrajeron un mínimo de 50 ml de sangre de cada animal. Los tubos se transportaron inmediatamente al laboratorio y se mantuvieron en agitación a temperatura ambiente hasta su procesado.

Una vez puesta a punto la técnica para la detección de células secretoras de IFN- γ , se emplearon como animales donantes de CMSP previamente sensibilizadas con los antígenos de *Hypoderma* 4 vacas de 4 a 8 años de edad procedentes de distintas explotaciones de la provincia de Lugo; estos animales habían presentado nódulos larvarios en el dorso el año anterior. La obtención de las muestras se llevó a cabo igual que en el caso anterior.

Animales no infestados: Ante la dificultad de encontrar ganado vacuno adulto que no hubiera estado nunca en contacto con el parásito, empleamos como animales donantes de CMSP no sensibilizadas 4 terneros procedentes de una explotación de ganado vacuno de la provincia de Lugo. La edad de los terneros escogidos era de aproximadamente 6-8 meses, de modo que pudiéramos tener la seguridad de que no habían salido al pasto y que, por lo tanto, no habían tenido oportunidad de entrar en contacto con las moscas de *Hypoderma* pero que, al mismo tiempo, tuvieran el sistema inmune desarrollado, evitando posibles interferencias con los anticuerpos calostrales. Al

igual que en los casos anteriores, las muestras sanguíneas se tomaron por punción de la vena caudal.

4.2.2. OBTENCIÓN Y PURIFICACIÓN DE LOS DISTINTOS ANTÍGENOS DE *Hypoderma*

La obtención del antígeno de *Hypoderma* se llevó a cabo a partir de larvas 1 de *H. lineatum* recogidas de la submucosa esofágica de bovinos sacrificados en matadero. Las L1 se congelaron a -20°C hasta el momento de elaborar el antígeno.

Para obtener el extracto total larvario (ET), las L1 se homogeneizaron con un triturador de tejidos, Polytron® (Kinemática AG), a razón de 10 larvas en 5 ml de tampón Tris-HCl 0,1 M, pH 7,5, y se aplicaron 5 ciclos de 1 minuto a 14.000 r.p.m. Para evitar elevaciones de temperatura, que pudieran activar los procesos enzimáticos o desnaturalizar las proteínas, entre cada ciclo, se mantuvo la mezcla en un baño con hielo. Posteriormente, el homogeneizado se dividió en alícuotas de 1 ml en tubos Eppendorf, que se centrifugaron durante 5 minutos a 13.000 r.p.m., para facilitar la separación de la fracción soluble.

Las fracciones antigénicas, denominadas hipoderminas A, B y C se purificaron mediante cromatografía de intercambio iónico empleando DEAE (diethylaminoetil) ligado a celulosa (DEAE-celulosa, Whatman) como intercambiador aniónico. El empaquetamiento y equilibrado de la columna se llevó a cabo con tampón Tris-HCl 0,1 M, pH 7,5. Para la elución de las distintas fracciones antigénicas se utilizó NaCl a distintas concentraciones, de modo que la hipodermina A eluyó con 50 ml de NaCl 0,1M, la B con 50 ml de NaCl 0,3 M y la C con 50 ml de NaCl 0,35 M.

Cada fracción se dializó durante 12 horas en agua destilada para eliminar el exceso de sales, utilizando una membrana semipermeable de celulosa (Sigma) que retiene proteínas con un peso molecular igual o superior a 12 kD.

La pureza de las distintas fracciones antigénicas se analizó mediante electroforesis en geles de poliacrilamida bajo condiciones reductoras (SDS-PAGE), de acuerdo con el sistema discontinuo clásico descrito por Laemmli (1970), que consiste en el empleo de dos tipos de geles: un gel empaquetador que concentra la muestra, dando como resultado una mejor resolución de las bandas proteicas y un segundo gel de resolución en el que tiene

lugar la separación de las distintas fracciones. En estos geles el tamaño de los poros es proporcional a la concentración de poliacrilamida. En este caso, se emplearon concentraciones de acrilamida del 12% para el gel de separación y del 3,5% para el de empaquetamiento.

Para la preparación de los geles se mezclaron los reactivos que figuran en la tabla 4.1 y a continuación se añadieron los iniciadores de la reacción de polimerización: persulfato de amonio (PSA) al 10% y N, N, N', N'-tetrametiletilendiamidina (TEMED).

Tabla 4.1. Composición de los geles de electroforesis

SDS-PAGE	Gel de Separación (12%)	Gel de Empaquetamiento (3,5 %)
Acrilamida 30%	2 ml	0,6 ml
Tris HCl 1,5 M (pH 8,8)	1,25 ml	-
Tris HCl 0,5 M (pH 6,8)	-	1,25 ml
SDS 10%	50 µl	50 µl
Agua destilada	1,6 ml	3 ml

Una vez elaborados los geles, se procedió a la preparación de las muestras a analizar. Para ello se resuspendieron directamente en el tampón muestra, cuya composición se recoge en la tabla 4.2, a razón de 1 volumen de tampón por cada 3 de muestra.

Tabla 4.2. Composición del tampón muestra

Tris pH 6,8	25 ml
Glicerol	20 ml
SDS 10%	4 g
B-mercaptoetanol	2 ml
Azul de bromofenol	1 mg
Agua destilada	3 ml

Para completar la desnaturalización de las proteínas las muestras se sometieron durante 5 minutos a 100° C, parándose la reacción de forma brusca al introducirlas en un baño de hielo.

Para la migración de las proteínas se utilizaron geles de pequeño formato (Mini Protean II® de Bio-Rad), aplicando una corriente constante de 150 V durante aproximadamente 40 minutos, hasta que el frente de migración alcanzó el límite inferior del gel. Como marcadores de peso molecular se utilizó el kit de patrones preteñidos Kaleidoscope® (Bio-Rad), con proteínas cuyo peso molecular oscilaba entre 7,7 y 244 KDa. Una vez finalizada la electroforesis, se visualizaron las bandas proteicas previa tinción con azul de Coomassie.

La concentración proteica del ET y de cada fracción se determinó mediante la técnica del BCA, que se basa en la reacción de las proteínas con el cobre; este, una vez reducido, se combina con el ácido bicintionínico, dando lugar a un color púrpura. Para ello se empleó un kit comercial (BCA Protein Assay Reagent, Pierce) y, tras la lectura de la placa a 540 nm, se elaboró la recta de calibración con ayuda del programa Excel de Microsoft.

Finalmente, cada antígeno se liofilizó, se ajustó su concentración a 100 µg/ml y se almacenó a -20° C hasta su uso.

4.2.3. DESARROLLO DE LA TÉCNICA ELISPOT

El protocolo de la técnica ELISPOT se basa en el desarrollado por Cabanelas (2013); se realiza a lo largo de tres días y consta de varias fases, que se describen a continuación.

1. Aislamiento de las células mononucleares de sangre periférica (CMSP): el aislamiento de las CMSP se realizó mediante centrifugación diferencial en un gradiente de densidad con una solución comercial (BIOCOLL®, Biochrom AG), cuya densidad era de 1,077 g/ml. De ésta forma, después de centrifugar, los eritrocitos y granulocitos, al tener una densidad mayor, se depositan en el fondo del tubo, mientras que las células

mononucleares, con una densidad menor, forman un nítido halo blanquecino por encima de la solución de aislamiento (Figura 4.1).

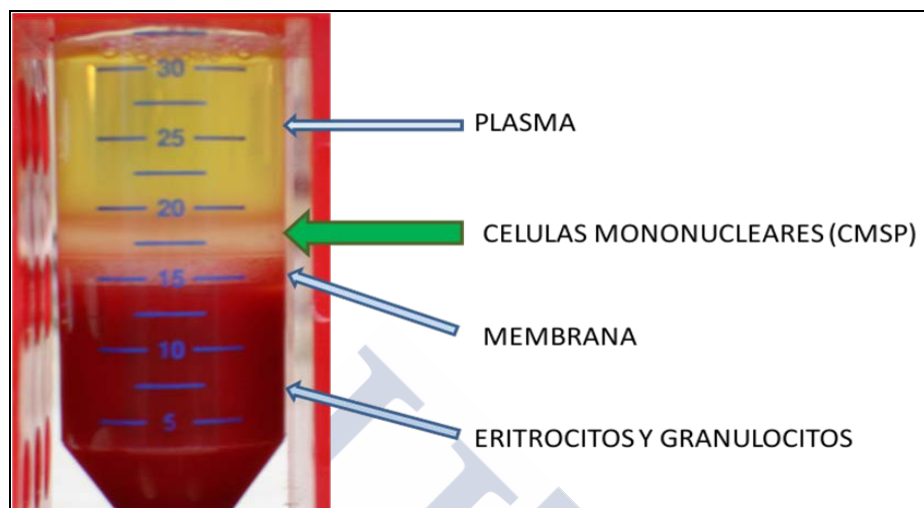


Figura 4.1. Aislamiento de las células mononucleares

Para ello, se emplearon tubos cónicos de 50 ml a los que se le añadieron 20 ml de Biocoll y 10 ml de sangre, evitando alterar la interfase entre ambos.

Los tubos se centrifugaron a 800 g durante 30 minutos y, posteriormente, el halo de CMSP se transfirió a tubos cónicos de 10 ml. Las células se lavaron dos veces con tampón fosfato estéril (PBS) mediante centrifugación a 1000 rpm durante 5 minutos. En el caso de observar un halo rojizo en el precipitado tras el primer lavado, se añadió 1 ml de agua destilada para lisar los eritrocitos y a continuación se procedió a un segundo lavado.

2. Recuento y cálculo de la viabilidad celular: para valorar la viabilidad celular se realizó la prueba de exclusión del Azul Trypan (Biochrom AG). Con este colorante, las células muertas aparecen teñidas de color azul. Para ello se añadieron 10 µl de la suspensión de células, 40 µl de PBS y 50 µl de colorante Azul Trypan en un microtubo tipo Eppendorf. Tras una incubación de 3 minutos a temperatura ambiente, se tomaron 20 µl de la mezcla y se colocaron en una cámara de Neubauer, procediendo al recuento

de células sin teñir al microscopio a 100 aumentos. El porcentaje de viabilidad se consideró aceptable cuando era superior al 90%.

El cálculo del número de CMSP se realizó de la siguiente manera:

$$\text{CMSP/ml} = N \times D \times 10^4$$

Siendo N el número de células en un cuadrado de los usados para recuento de linfocitos y D el factor de dilución de la muestra, en este caso 10.

Para determinar el número total de CMSP, se multiplicó el resultado anterior por el volumen de células disponible.

$$\text{CMSP totales} = \text{CMSP/ml} \times \text{ml (volumen total)}$$

3. Preparación de la placa e incubación celular: la elección del modelo de placas resulta de vital importancia en el buen resultado del ELISPOT, puesto que condiciona la unión eficiente del anticuerpo primario y, por consiguiente, la calidad y el número de manchas desarrolladas. En nuestro caso, se emplearon placas de 96 pocillos con fondo de polifluoruro de vinilideno (PVDF, Millipore, 0,45 μm).

a. Pretratamiento: debido a la naturaleza hidrofóbica de las placas de PVDF fue necesario humedecer los pocillos con alcohol para hidrofilar la membrana, permitiendo de esta manera la unión del anticuerpo primario. Para ello se utilizaron 50 μl de etanol al 70% durante 2 minutos. Transcurrido el tiempo de incubación, las placas se vaciaron y el alcohol se eliminó realizando dos lavados consecutivos con tampón fosfato (PBS, pH 7,5).

b. Sensibilización: a continuación, las placas se tapizaron con un anticuerpo monoclonal anti-IFN- γ de vacuno (Serotec), a la concentración de 1 $\mu\text{g/ml}$. El anticuerpo se diluyó en tampón PBS y se añadió un volumen de 100 μl por pocillo. Posteriormente, las placas se introdujeron en la nevera a 4° C y se incubaron toda la noche. Al día siguiente, las placas se vaciaron y lavaron 3 veces con 200 μl de PBS.

c. Bloqueo de los sitios de unión específicos: una vez eliminado el anticuerpo no unido a la membrana, las placas se incubaron 2 horas a temperatura ambiente en agitación, empleándose seroalbúmina bovina (BSA, Sigma) al 1% en PBS como solución de bloqueo.

d. Incubación celular: simultáneamente al paso anterior, se preparó el medio de cultivo completo (MC) con la siguiente composición:

- RPMI 1640® (Invitrogen)
- 10% de suero fetal bovino (SFB, Biochrom AG) descomplementado a 56° C en baño de agua durante 30 minutos
- 1% de solución antibiótica-antimicótica (Sigma) compuesta por penicilina G (10000 UI/ml), sulfato de estreptomicina (10 mg/ml) y anfotericina B (25 µg/ml)

Una vez aisladas y purificadas las células, se calculó el volumen correspondiente a la concentración de 200.000 células/pocillo, que ofreció en ensayos previos los mejores resultados en cuanto a definición de manchas. Como mitógeno se empleó la fitohemaglutinina (PHA, Biochrom AG) a una concentración de 6 µg/pocillo.

Con la finalidad de valorar el efecto de la adición del antígeno a la producción de IFN-γ por parte de las células, se añadieron las hipoderminas A, B y C, además del ET, a concentraciones de 100 µg/ml.

Considerando un volumen total de 200 µl por pocillo, el volumen restante se completó con medio de cultivo completo.

Para la validación de la prueba se incluyeron los siguientes controles:

- **Blanco:** conteniendo únicamente MC. Sirve para descartar la presencia de falsos positivos.
- **Control negativo:** compuesto por un determinado número de células en MC sin ningún tipo de estímulo. Permite cuantificar el número de células con producción espontánea de la citoquina en cuestión
- **Control positivo:** conteniendo un determinado número de células estimuladas con una cantidad conocida de mitógeno en MC. La adición de un activador

policlonal de las células T sirve para controlar tanto la viabilidad celular como la funcionalidad del ensayo. Hace posible evaluar el incremento del número de células productoras de una citoquina debido al efecto estimulante del mitógeno. Cada prueba se ensayó por triplicado, tomando como resultado la media de las tres determinaciones.

Las placas se incubaron durante 24 horas a 37° C en una atmósfera con 5% de CO₂ y 95% de humedad. Durante la incubación se evitó cualquier movimiento de las placas y estas se envolvieron con papel de aluminio para favorecer la dispersión homogénea de la temperatura a todos los pocillos.

Tras retirarlas del incubador, las placas se lavaron cinco veces con 200 µl de PBS Tween 0,01%, para eliminar totalmente las células.

4. Adición del anticuerpo secundario: posteriormente se añadieron a cada pocillo 100 µl del anticuerpo monoclonal anti-IFN-γ de bovino biotinilado (Serotec) a la concentración de 1 µg/ml en tampón PBS. Para evitar la aparición de agregados que aumentasen el ruido de fondo, el anticuerpo secundario se pasó a través de un filtro de 0,22 µm de diámetro de poro (Millex®-GP). Las placas se incubaron 2 horas a temperatura ambiente y en agitación. Seguidamente se efectuaron tres lavados consecutivos con 200 µl de PBS-Tween 0.01% para eliminar el exceso de anticuerpo.

5. Revelado de la reacción y recuento de manchas: para el revelado de la reacción se añadieron 100 µl de Streptavidin-Alkalinfosfatasa (Sigma) en tampón Tris pH 8 (TBS) a la dilución 1/1000. Las placas se incubaron 1 hora a temperatura ambiente y en agitación, tras lo cual se lavaron 3 veces con PBS-Tween 0,01% y 2 veces con PBS para eliminar el detergente. Finalmente se procedió al revelado de las placas mediante la adición de 100 µl del cromógeno BCIP-NBT (Abcam).

Las placas se incubaron de 5 a 15 minutos en oscuridad. Transcurrido este tiempo, se comprobó la aparición de manchas en la membrana y se detuvo la reacción con agua destilada, lavando ambos lados de la misma.

Tras dejar secar completamente la membrana, se procedió a recortar el fondo de las placas con un sacabocados (AELVIS®), de modo que las membranas del fondo quedaron adheridas a hojas de plástico adhesivas.

Estas plantillas fueron escaneadas en un analizador de imagen (ELIScan), pero ante la imposibilidad de realizar un recuento automático de todos los pocillos, el recuento de manchas se realizó de forma cualitativa, estableciéndose una escala de 0 a 5 puntos (Figura 4.2); de manera que el 0 correspondía a la ausencia total de puntos y el 5 al máximo número de puntos por pocillo. La escala numérica se asignó de acuerdo con los siguientes intervalos: 1 (< 50), 2 (50-100), 3 (100-200), 4 (200-400) y 5 (> 400).

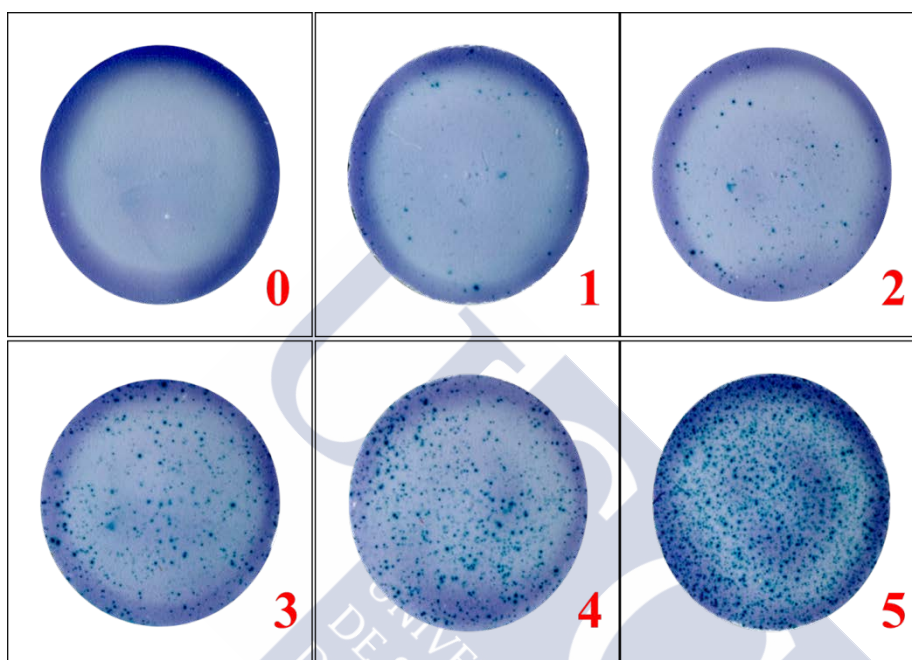


Figura 4.2. Escala cualitativa para la estimación del número de manchas

4.2.4. DETECCIÓN DE IFN- γ EN LOS SOBRENADANTES CELULARES

4.2.4.1. Cultivos celulares y obtención de los sobrenadantes

Para valorar los niveles de citoquina presentes en los sobrenadantes celulares las CMSP se cultivaron en placas de microtitulación de forma análoga a las placas de ELISPOT. De esta manera, cada cultivo se realizó por duplicado y se incubó en las mismas condiciones de humedad y temperatura. Tras retirarlas del incubador, las placas se centrifugaron durante 10 minutos a 300 g, de forma que las CMSP se desplazaron al fondo del pocillo. Posteriormente se procedió a la recogida de los sobrenadantes, que se transfirieron a otra placa de microtitulación (Deltalab) que se congeló a -20° C para la

posterior determinación, mediante ELISA sándwich, de los niveles de las distintas citoquinas.

4.2.4.2. ELISA sándwich

La determinación de las concentraciones de IFN- γ presentes en los sobrenadantes de los cultivos celulares se realizó empleando un ELISA sándwich puesto a punto por Panadero *et al.* (2009) con el siguiente protocolo:

1. Sensibilización de las placas: se emplearon placas de poliestireno (Nunc Maxisorb®) de fondo plano, que se tapizaron con 100 μ l de anticuerpo de captura anti-IFN- γ de bovino (Serotec) a la concentración de 1 μ g/ml. El anticuerpo se diluyó en tampón PBS pH 7,2. Las placas se incubaron en la nevera durante toda la noche a 4° C. Al día siguiente, las placas se lavaron cuatro veces con 200 μ l de PBS-Tween 0,1%. Seguidamente se bloquearon los sitios de unión inespecíficos con BSA al 3% preparada en PBS-Tween 0,1%. Las placas se incubaron a temperatura ambiente durante una hora y en agitación.

2. Adición de las muestras: a continuación se añadieron las muestras y controles a las placas. Para ello, se dispensaron 50 μ l de sobrenadante previamente descongelado y 50 μ l de BSA a cada pocillo. En la columna blanco no se añadió muestra y como control positivo se empleó un sobrenadante con niveles elevados de IFN- γ y el suero de una vaca con valores altos de esta citoquina. Las placas se incubaron durante una hora en agitación a temperatura ambiente, tras la cual se lavaron cuatro veces con 200 μ l de PBS-Tween 0.1%.

Tenemos que señalar que también se determinaron, mediante esta técnica, los niveles de citoquinas presentes en el suero de los animales empleados en este estudio.

3. Anticuerpo secundario biotinilado: seguidamente se añadieron a cada pocillo 100 μ l de anticuerpo biotinilado anti-IFN- γ de bovino (Serotec) a una dilución 1/1000 en BSA 3%. Las placas se incubaron a temperatura ambiente y en agitación durante una hora, y a continuación se lavaron cuatro veces con 100 μ l de PBS-Tween 0,1%.

4. Adición de la enzima: posteriormente se añadió a la placa la streptavidin-HRP (Sigma) a una dilución 1/1000. La enzima se diluyó en BSA 3%. Las placas se incubaron a temperatura ambiente durante 45 minutos; y después se lavaron tres veces con 200 µl de PBS- Tween 0.1% y dos veces con 200 µl de PBS.

5. Revelado de la reacción: para ello se diluyeron, al abrigo de la luz, 0,01 g de ortofenilendiamina (OPD, Sigma®) en 11 ml de tampón citrato pH 5. A esta dilución se añadieron 4 µl de agua oxigenada al 30% y se dispensaron 100 µl de la misma por pocillo. Las placas se mantuvieron en oscuridad durante cinco minutos, tras los cuales se detuvo la reacción con 100 µl de ácido sulfúrico 3N. Finalmente se realizó la lectura de las placas en un espectrofotómetro modelo 680 de Bio Rad empleando los filtros de 490 y 450 nm.

4.2.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Los datos obtenidos en los distintos apartados de este estudio se procesaron con ayuda de la hoja de cálculo Microsoft Office Excel 2010. Los análisis estadísticos se realizaron con el paquete estadístico R.

En el apartado de estadística descriptiva, se empleó la media como indicador de tendencia, y la desviación estándar y los valores máximo y mínimo como medidas de dispersión.

Se utilizó la prueba t de Student para muestras dependientes para analizar si había diferencias significativas entre los cultivos procedentes de un mismo animal incubados con los distintos antígenos parasitarios en presencia o ausencia de mitógeno.

Se empleó la prueba t de Student de muestras independientes para estudiar si existían diferencias significativas entre los cultivos procedentes de animales sensibilizados y sin sensibilizar.

4.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.3.1. DETERMINACIÓN DEL NÚMERO DE CÉLULAS SECRETORAS DE IFN- γ MEDIANTE ELISPOT

4.3.1.1. En cultivos de CMSP procedentes de animales no sensibilizados frente a *Hypoderma*

En la figura 4.3 aparece representado el número de células secretoras (CS) de IFN- γ en cultivos de CMSP procedentes de animales no sensibilizados tras la estimulación con distintos antígenos obtenidos de L-1 de *Hypoderma lineatum*.

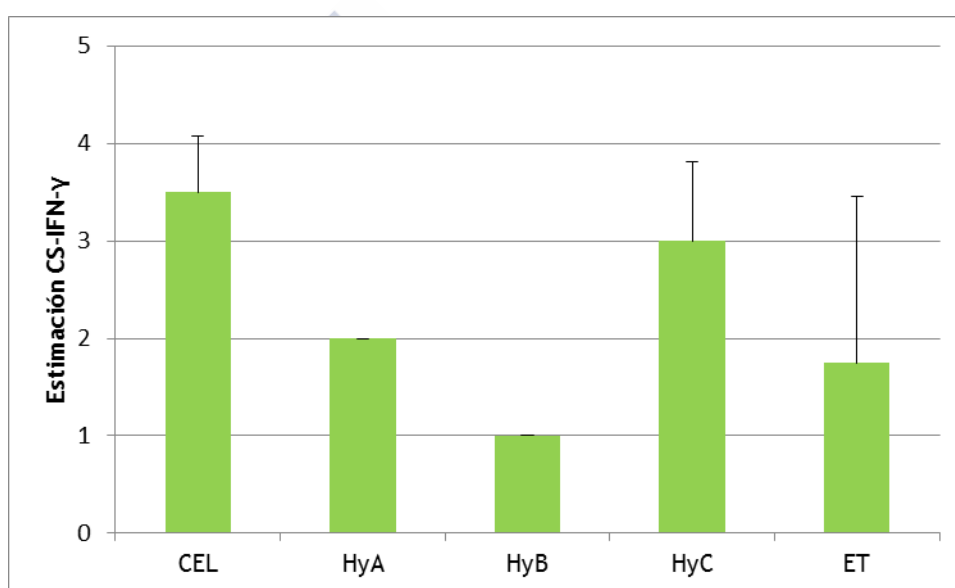


Figura 4.3. Estimación del número de CS-IFN- γ en cultivos de CMSP de animales no sensibilizados tras la estimulación con distintos antígenos de *H. lineatum*

La adición de los antígenos de *Hypoderma* a las CMSP se tradujo en un descenso del número de CS-IFN- γ . De las distintas fracciones antigénicas, fue la HyB la que más redujo el número de CS-IFN- γ , seguida por el ET y la HyA. La HyC, en cambio, fue la que menos afectó a la síntesis de esta citoquina.

Estos resultados vienen a confirmar el efecto inmunosupresor del antígeno bruto larvario, así como de las distintas fracciones purificadas. Al comparar el efecto ejercido por los distintos antígenos, comprobamos que nuestros resultados concuerdan con Chabaudie y Boulard (1993), quienes demostraron *in vitro* que la HyC por sí sola no

poseía una actividad directa proliferativa, citostática o tóxica sobre los cultivos linfocitarios de ganado bovino; del mismo modo observaron *in vivo* que la inyección de HyC a bovinos infestados y no infestados previamente no modificaba la respuesta celular y humoral específica.

Al estimular conjuntamente los cultivos con el mitógeno PHA y los distintos antígenos parasitarios vemos que, al igual que en el caso anterior, todos los antígenos provocaron una disminución en el número de células secretoras de IFN- γ (Figura 4.4); de nuevo fue la HyB la que redujo en mayor medida el efecto de la PHA, seguida por la HyA y el extracto total, mientras que la HyC apenas causó un efecto supresor sobre la acción del mitógeno.

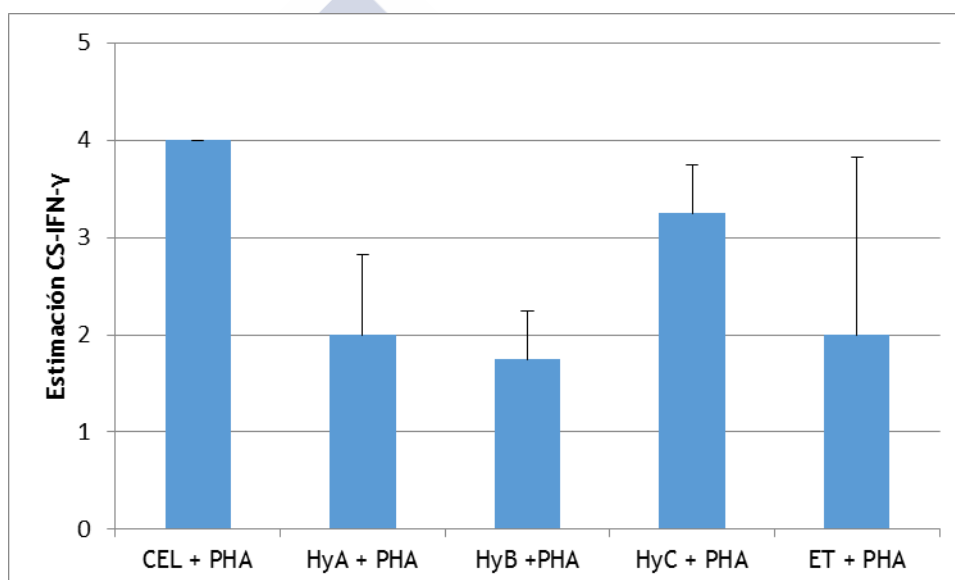


Figura 4.4. Estimación del número de CS-IFN- γ en cultivos de CMSP de animales no sensibilizados tras la estimulación con mitógeno y antígenos de *H. lineatum*

Al comparar el efecto de los antígenos parasitarios en cultivos estimulados y no estimulados con el mitógeno (Figura 4.3), se comprueba que la respuesta es paralela en ambos casos, si bien el número de CS-IFN- γ fue, en general, superior en los pocillos que contenían mitógeno, siendo en los que contenían HyB donde se observó una mayor diferencia entre estimulados y no estimulados. Este hecho concuerda con lo observado por Chabaudie (1990), quien concluyó que mientras que la HyA y la HyC inhiben los linfocitos estimulados por la PHA, la HyB ejerce un efecto estimulante. En este sentido, Moiré *et al.* (1997) demostraron que la HyA degrada los marcadores de superficie

implicados en la activación de los linfocitos, inhibiendo por tanto la secreción de determinadas citoquinas, entre las que se encuentra el IFN- γ . De acuerdo con estos autores, el efecto de la HyA sobre los linfocitos comenzaría en las fases tempranas de la estimulación y los efectos podrían revertirse retirando la HyA; esta actividad enzimática también podría estar implicada en la inhibición de la proliferación linfocitaria.

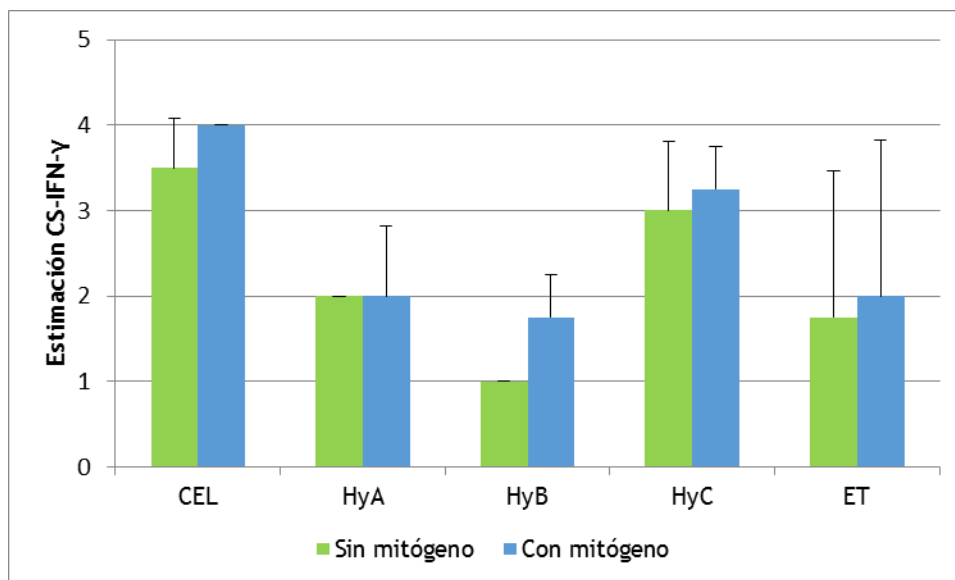


Figura 4.5. Comparación del efecto de los antígenos parasitarios en cultivos de CMSP de animales no sensibilizados estimulados y no estimulados con el mitógeno PHA

Llama la atención el hecho de que tanto en los cultivos estimulados como en los no estimulados con mitógeno, la HyB sea la fracción que más disminuye en número de CS-IFN- γ , ya que distintos autores encontraron que la HyA es la proteína con mayor actividad inhibidora sobre el sistema inmune (Fisher *et al.*, 1991; Chabaudie y Boulard, 1992; Moiré *et al.*, 1997). De hecho, el efecto modulador de la HyA sobre el mitógeno PHA ha sido ampliamente estudiado. Chabaudie (1990) señaló que esta acción moduladora se ejerce sobre los linfocitos y no sobre los mitógenos. En este sentido, Nicolas-Gaulard *et al.* (1995) observaron un descenso en la producción de IL-2 por linfocitos estimulados por la PHA en presencia de la HyA. Estos autores relacionan la baja producción de esta citoquina con un aumento en la secreción de prostaglandinas (PGE₂). Estas prostaglandinas son potentes antiproliferativos producidos por monocitos/macrófagos que inhiben la secreción de IL-2 y la síntesis de IFN- γ por los linfocitos T en el caso de infecciones experimentales con *Leishmania* ó *Trypanosoma*

cruzy (Tarleton, 1988). Por tanto, el efecto inmunosupresor de la HyA podría deberse, en parte, a la interacción con moléculas implicadas en la regulación de la producción de PGE2 y a su efecto directo sobre monocitos y linfocitos mediante la degradación de proteínas de membrana. Entre los mecanismos moduladores de la HyA, también se encuentra su capacidad para degradar las IgG, anulando su actividad biológica. Este mecanismo supone una nueva vía de evasión que puede contribuir a la supervivencia de las L-1 en el hospedador (Pruett, 1993).

De acuerdo con nuestros resultados, la HyB también jugaría un papel importante en la inmunosupresión generada por las larvas 1 de *Hypoderma* durante su migración. Así, Boulard y Bencharif (1984) pusieron en evidencia la actividad inhibidora de las hipoderminas A y B sobre el complemento hemolítico bovino, lo que permitiría al parásito eludir la reacción temprana de defensa del hospedador. Más recientemente Godon (1994) observó que las HyA e HyB inhiben la actividad quimiotáctica de los neutrófilos *in vitro*, mientras que Chabaudie (1987) demostró lo mismo *in vivo*.

Respecto a la HyC, Chabaudie y Boulard (1993) demostraron que esta hipodermina coincubada *in vitro* con linfocitos de ganado no infestado provoca una disminución dosis-dependiente de la respuesta inducida por la PHA. Una de las hipótesis barajadas por estos autores sobre este efecto modulador, es la competición de la HyC con la PHA por un receptor específico linfocitario. Otra hipótesis se basa en una actividad previa de la HyC sobre los macrófagos o linfocitos que reduciría su respuesta al mitógeno.

Por otra parte, en opinión de estos autores, el hecho de que la HyC o la HyA no presenten una actividad moduladora sobre la respuesta blastogénica de los linfocitos a la Con A y sí la haya frente a la PHA, se debería a que estos dos mitógenos poseen diferentes mecanismos de activación linfocitaria, relacionados con su actividad enzimática sobre citoquinas o mediadores y/o por su unión a receptores específicos.

4.3.1.2. En cultivos de CMSP procedentes de animales sensibilizados frente a *Hypoderma*

En la figura 4.6 aparece representado el número de CS-IFN- γ en cultivos de CMSP, procedentes de vacas con infestaciones previas por *H. lineatum* tras la estimulación con distintos antígenos obtenidos de L1 de *H. lineatum*.

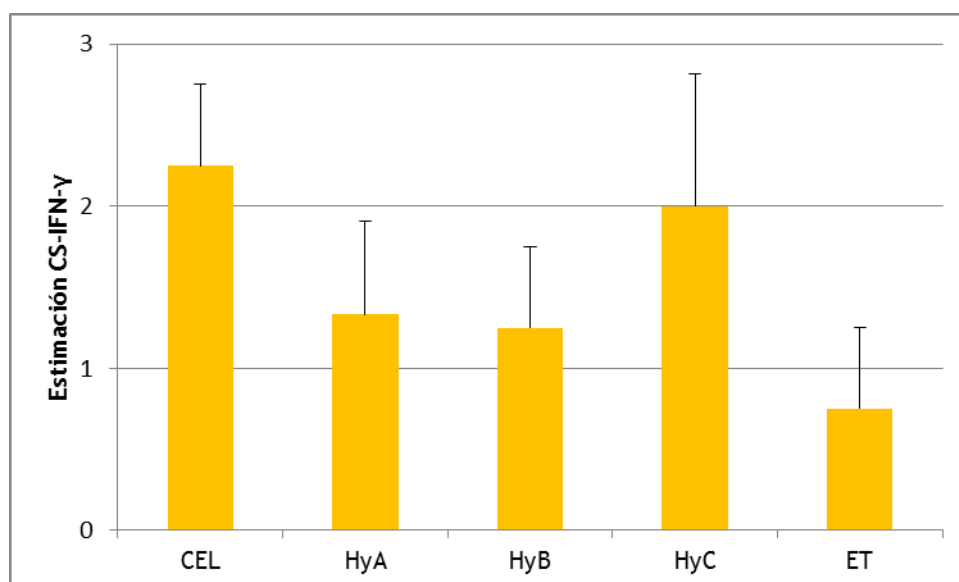


Figura 4.6. Estimación del número de CS-IFN- γ en cultivos de CMSP de animales sensibilizados tras la estimulación con distintos antígenos de *H. lineatum*

En los cultivos procedentes de vacas con infestaciones previas por *Hypoderma*, la adición de antígenos de *H. lineatum* a las CMSP también produjo un descenso en el número de CS-IFN- γ . En este caso fue el extracto total el que tuvo un mayor efecto supresor sobre la síntesis de esta citoquina, seguido por la HyB e HyA, respectivamente. La HyC, por el contrario, fue la que menos afectó al número de CS-IFN- γ .

Al añadir el mitógeno observamos que los distintos antígenos tuvieron un efecto supresor sobre la síntesis de IFN- γ por parte de las CMSP (Figura 4.7). Mientras que el extracto total fue la fracción que más redujo el número de CS-IFN- γ , las hipoderminas A y B causaron un ligero descenso del mismo. Por el contrario, la HyC no tuvo ningún efecto sobre la síntesis de IFN- γ .

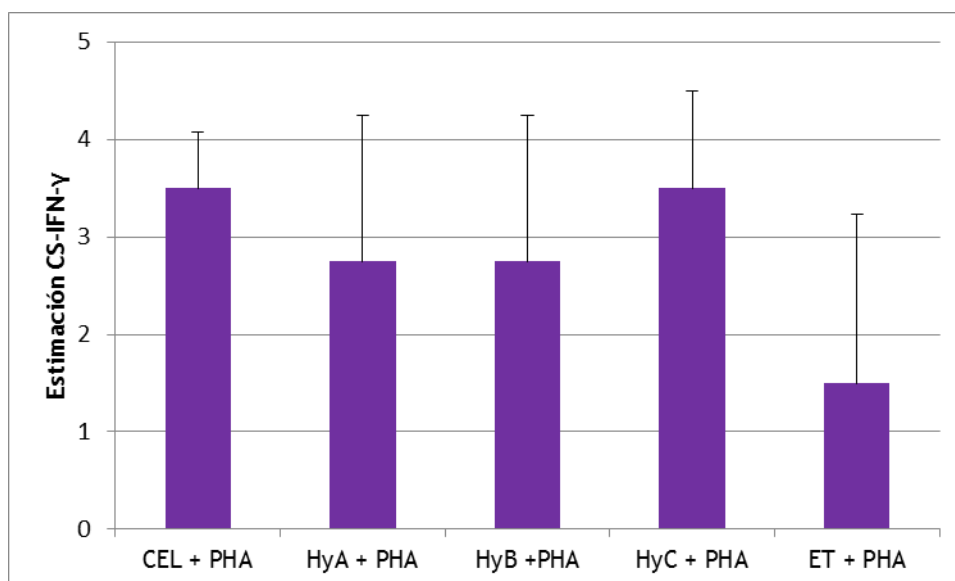


Figura 4.7. Estimación del número de CS-IFN- γ en cultivos de CMSP de animales sensibilizados tras la estimulación con mitógeno y antígenos de *H. lineatum*

Estos resultados coinciden en parte con los de Panadero *et al.* (2009), quienes observaron que la coincubación de CMSP de ganado vacuno previamente infestado estimuladas con ET y PHA producía un descenso significativo en la secreción de IFN- γ . Por el contrario, estos autores observaron un incremento de los niveles de esta citoquina al incubar las células con HyA, efecto que no se observó en este estudio.

Al comparar el efecto de los antígenos parasitarios en cultivos con y sin fitohemaglutinina (Figura 4.8) se observa que el número de CS-IFN- γ fue aproximadamente el doble en los pocillos estimulados con mitógeno comparado con los no estimulados, si bien los resultados fueron paralelos en ambos cultivos.

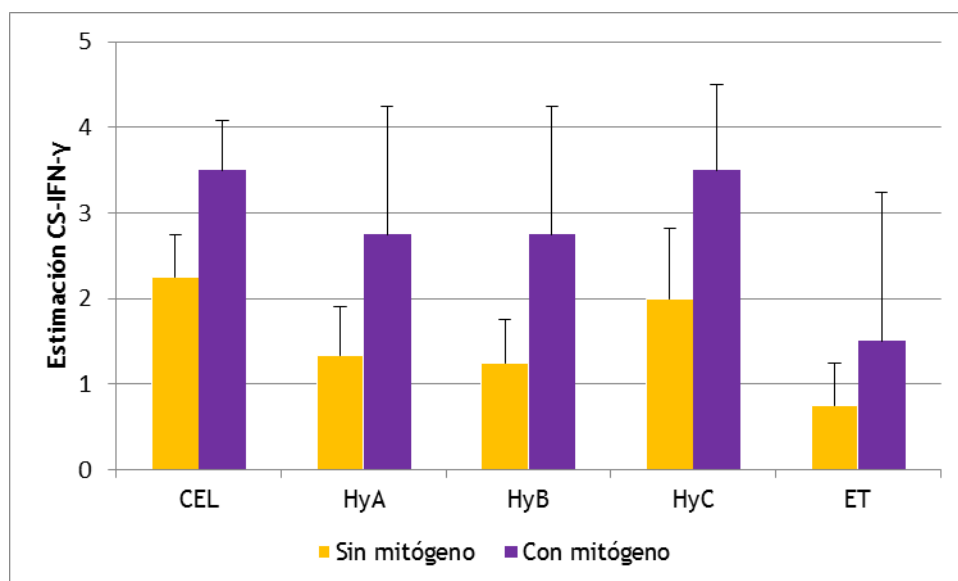


Figura 4.8. Comparación del efecto de los antígenos parasitarios en cultivos de CMSP de animales sensibilizados estimulados y no estimulados con el mitógeno PHA

4.3.1.3. Comparación de la respuesta en animales sensibilizados y no sensibilizados

La figura 4.9 recoge los resultados obtenidos en los dos grupos de animales, sensibilizados y no sensibilizados, tras la estimulación con el mitógeno PHA y/o los distintos antígenos parasitarios.

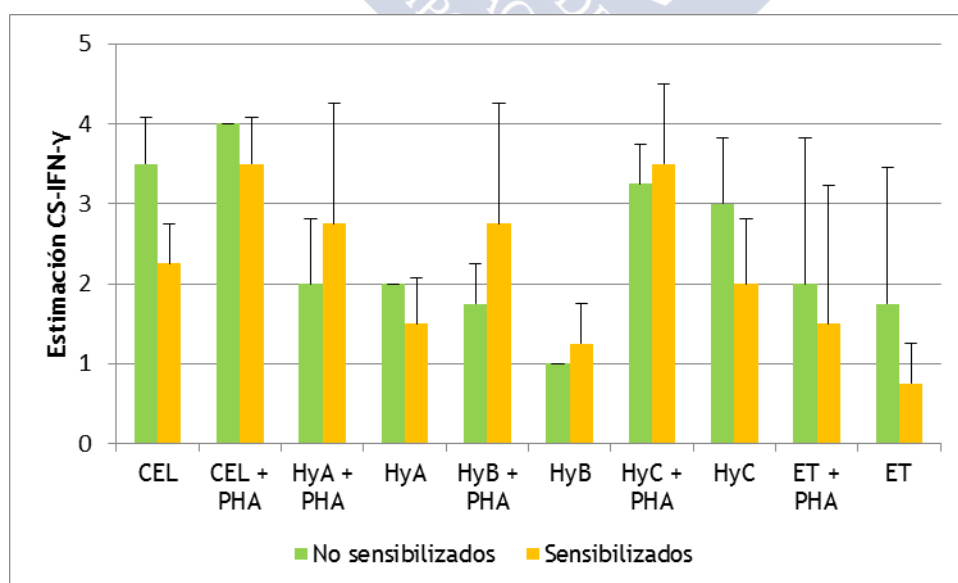


Figura 4.9. Comparación del número de CS-IFN-γ en cultivos de animales no sensibilizados y sensibilizados tras la estimulación con mitógeno y/o distintos antígenos de *H. lineatum*

La incubación de los linfocitos con mitógeno se tradujo en un incremento en la síntesis de IFN- γ tanto en animales no sensibilizados como sensibilizados. Si bien la producción espontánea de IFN- γ fue mayor en los animales no sensibilizados, el efecto del mitógeno fue más acusado en los previamente sensibilizados, existiendo diferencias evidentes entre los pocillos con y sin mitógeno.

Por otro lado, la adición de las distintas fracciones antigénicas produjo un descenso en el número de células secretoras de dicha citoquina en ambos grupos, observándose una gran variabilidad en la respuesta de los animales. Este hecho ya fue subrayado por Baron y Weintraub (1987), quienes comprobaron que la respuesta linfocitaria a la estimulación con mitógeno y antígeno varía considerablemente de unos animales a otros, especialmente en animales reinfestados.

Como en el caso de *Hypoderma*, varios estudios han puesto de manifiesto que las secreciones de otros dípteros ejercen un efecto inhibitor sobre la producción de IFN- γ . Zhao *et al.* (2009) identificaron tres péptidos inmunoreguladores en la saliva de dípteros de la especie *Tabanus pleskei*, que inhibían la secreción de IFN- γ mediante la estimulación de la producción de IL-10. Por otro lado, Elkington *et al.* (2009) comprobaron mediante citometría de flujo que el antígeno de excreción-secreción de larvas de *Lucilia cuprina* inhibía la activación y proliferación de linfocitos de ganado ovino; además constataron mediante RT-PCR que dicha proteína ejercía un efecto inhibitor sobre la transcripción de IFN- γ , IL-4, IL-10 e IL-13.

En lo que se refiere a otros artrópodos, algunos trabajos han estudiado los efectos de antígenos salivales de algunas especies de garrapatas sobre la modulación del sistema inmunitario del hospedador y la producción de citoquinas. Ramachandra y Wikel (1992) demostraron que la incubación de linfocitos con extracto de glándulas salivales de *Dermacentor andersoni* suprimía la respuesta proliferativa al mitógeno ConA, al tiempo que inhibía la síntesis de diversas citoquinas, IL-1, TNF- α , IL-2 e IFN- γ . Más tarde Kopecky *et al.* (1999) comprobaron *in vitro* que el extracto de glándulas salivales de *Ixodes ricinus* inhibía la producción de IFN- γ al estimular la síntesis de IL-10, teniendo esta última un efecto inmunosupresor. En estudios recientes, Brake y De León (2012) observaron mediante RT-PCR una disminución de la transcripción del

IFN- γ , TNF- α e IL-12 en cultivos de macrófagos estimulados con extracto de glándulas salivales de *Rhipicephalus microplus*.

4.3.2. DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE IFN- γ MEDIANTE ELISA SÁNDWICH

Las citoquinas secretadas por las células mononucleares pueden ser detectadas en los sobrenadantes de los cultivos celulares empleando un par de anticuerpos específicos para la citoquina a analizar, en este caso IFN- γ .

4.3.2.1. En sobrenadantes de cultivos de CMSP procedentes de animales no sensibilizados frente a *Hypoderma*

En la figura 4.10 aparecen representados los niveles de IFN- γ en sobrenadantes de cultivos de CMSP procedentes de animales no sensibilizados tras la estimulación con distintos antígenos obtenidos de L1 de *Hypoderma lineatum*.

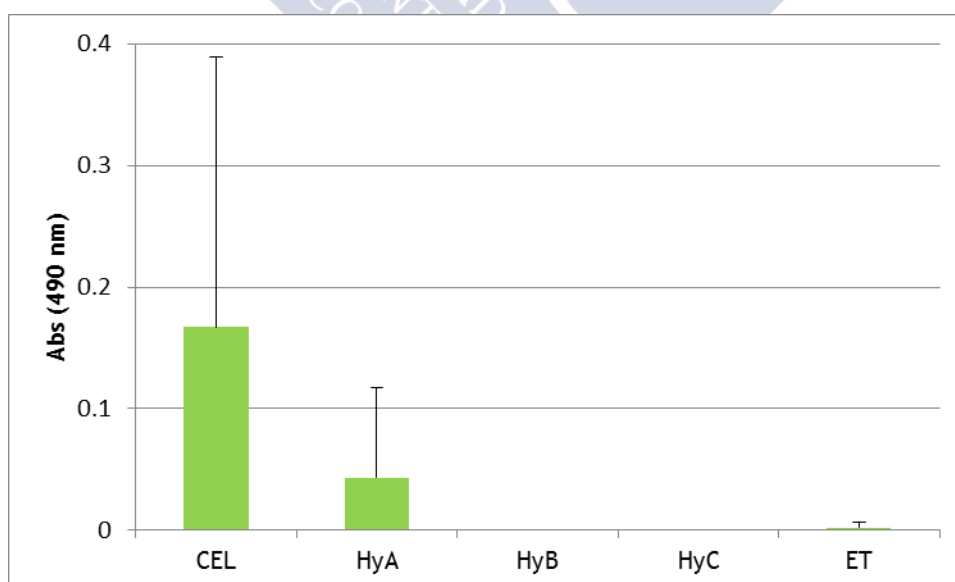


Figura 4.10. Niveles de IFN- γ en sobrenadantes de cultivos de CMSP de animales no sensibilizados tras la estimulación con los distintos antígenos de *H. lineatum*

En la gráfica anterior se puede ver como la incubación con los distintos antígenos de *Hypoderma* se tradujo en un descenso en los niveles de IFN- γ en los sobrenadantes celulares, si bien mediante la prueba t de Student para muestras dependientes no se encontraron diferencias significativas en los niveles de esta citoquina entre los pocillos que contenían únicamente células y los incubados con los antígenos parasitarios (Tabla 4.1).

Tabla 4.1. Valores p de la prueba t de Student al comparar el efecto de los distintos antígenos parasitarios en cultivos de CMSP de animales no sensibilizados frente a *Hypoderma* (* nivel de significación $p \leq 0,05$)

Prueba t de Student para muestras dependientes (p)				
	HyA	HyB	HyC	ET
CEL	0,876	0,179	0,236	0,217
HyA		0,290	0,331	0,380
HyB			0,514	0,146
HyC				0,275

Hemos de señalar que, en el caso de las hipoderminas B y C, los niveles de IFN- γ producida de forma espontánea por las células eran inferiores al límite de detección del test (1 ng/ml). En relación a la incubación con ET, se observaron niveles muy bajos de IFN- γ , mientras que la HyA fue la que menos redujo la secreción de esta citoquina.

La adición de **mitógeno** a los cultivos estimuló la producción de citoquina, de modo que se produjeron niveles detectables de IFN- γ en todos los pocillos (Figura 4.11). No obstante, una vez más se vio que la incubación con los distintos antígenos disminuyó la cantidad de citoquina secretada con respecto a los incubados sin antígeno, siendo los que albergaban HyB los que tuvieron los valores más elevados de IFN- γ y los que contenían HyA donde se observaron los niveles más bajos de esta citoquina.

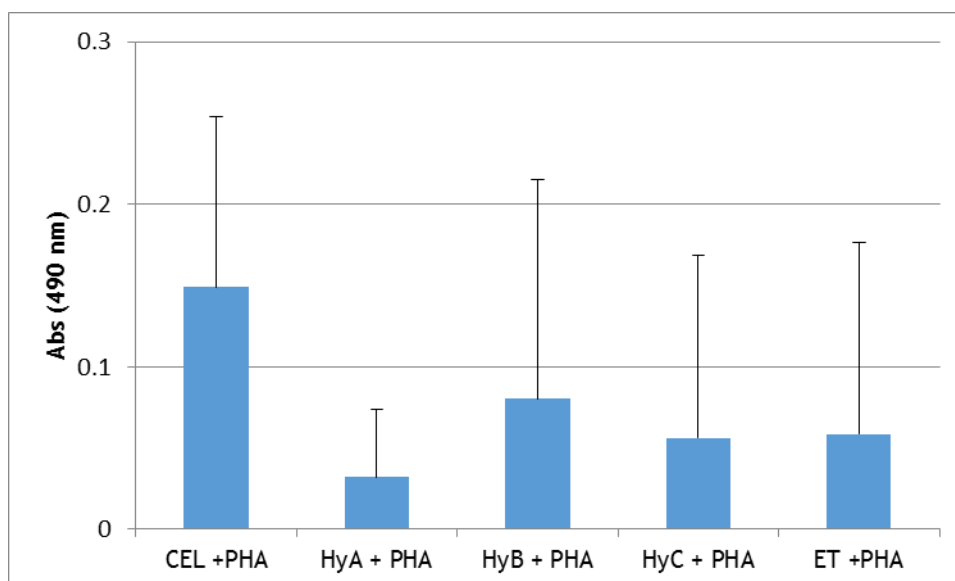


Figura 4.11. Niveles IFN- γ en sobrenadantes de cultivos de CMSP de animales no sensibilizados tras la estimulación con mitógeno y antígenos de *H. lineatum*

No obstante, a pesar de las diferencias observadas entre los distintos antígenos (Tabla 4.2), estas no fueron significativas en ningún caso.

Tabla 4.2. Comparación del efecto de los distintos antígenos parasitarios en cultivos de CMSP de animales no sensibilizados frente a *Hypoderma* y estimulados con PHA (* nivel de significación $p \leq 0,05$)

Prueba t de Student para muestras dependientes (p)				
	HyA + PHA	HyB + PHA	HyC + PHA	ET + PHA
CEL + PHA	0,306	0,124	0,093	0,230
HyA + PHA		0,553	0,941	0,783
HyB + PHA			0,159	0,324
HyC + PHA				0,481

Al comparar los niveles de citoquina en los sobrenadantes de los cultivos con y sin mitógeno (Figura 4.12), vemos que las diferencias fueron evidentes en todos los

casos excepto en el de la HyA, con la que los niveles de IFN- γ fueron similares en los pocillos con y sin mitógeno.

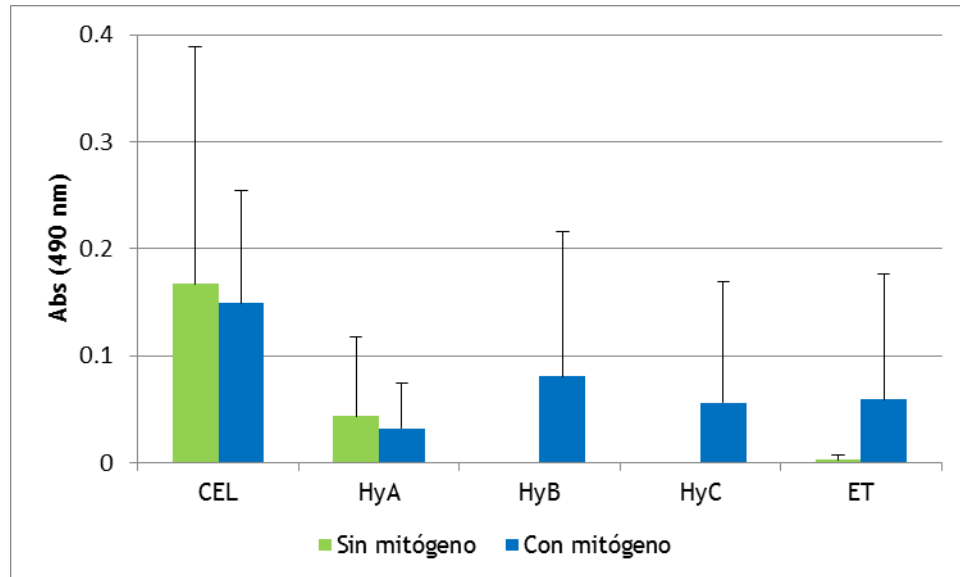


Figura 4.12. Comparación de los niveles de IFN- γ en sobrenadantes de cultivos de CMSP de animales no sensibilizados tras la estimulación con mitógeno y/o distintos antígenos de *H. lineatum*

Por otro lado, el análisis estadístico reveló que el mitógeno no tuvo efectos significativos sobre la producción de IFN- γ por parte de las CMSP de animales no sensibilizados (Tabla 4.3), debido a que, como se ve en la gráfica, la desviación es muy alta.

Tabla 4.3. Comparación del efecto de los antígenos de *H. lineatum* con y sin mitógeno (* nivel de significación $p \leq 0,05$)

Prueba t de Student para muestras dependientes (<i>p</i>)	
CEL x CEL + PHA	0,409
HyA x HyA + PHA	0,688
HyB x HyB + PHA	0,216
HyC x HyC + PHA	0,249
ET x ET + PHA	0,979

4.3.2.2. En sobrenadantes de cultivos de CMSP procedentes de animales sensibilizados frente a *Hypoderma*

En los cultivos celulares procedentes de vacas con contactos previos con el parásito se observa (Figura 4.13) que los niveles de IFN- γ en los sobrenadantes se encontraba en todos los casos por encima del límite de detección de la prueba; en estos animales existe una respuesta de memoria que amplificaría la respuesta celular ante posteriores contactos con el parásito, traduciéndose en un número menor de larvas que completan su desarrollo.

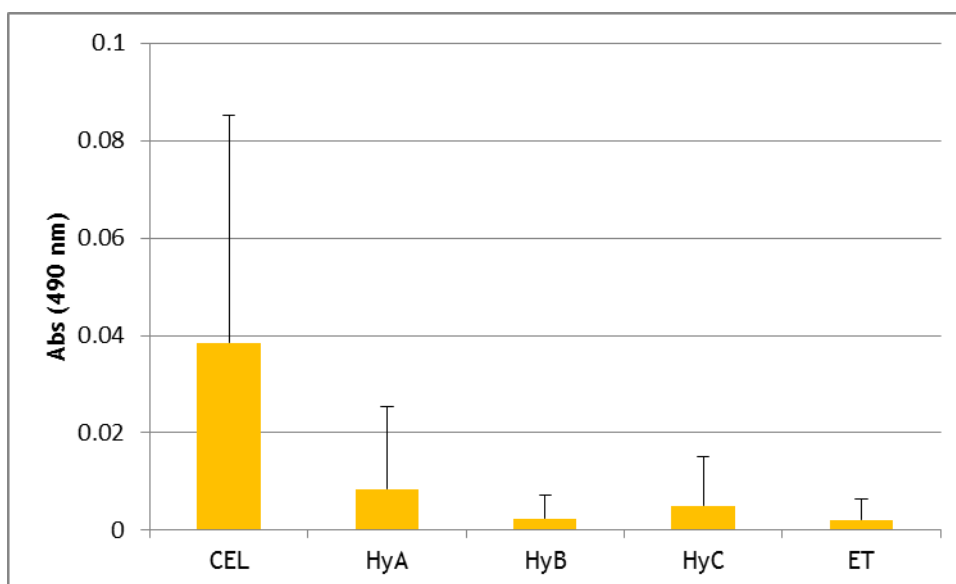


Figura 4.13. Niveles de IFN- γ en sobrenadantes de cultivos de CMSP de animales sensibilizados tras la estimulación con los distintos antígenos de *H. lineatum*

Tal y como se refleja en la tabla 4.4, la disminución de los niveles de IFN- γ asociada a la adición de los antígenos fue significativa en todos los casos, siendo la HyB y el ET las fracciones que más suprimieron la secreción de esta citoquina. La HyC por su parte también indujo un descenso en los niveles de IFN- γ , menos acusado que en el caso anterior, pero superior al observado en la incubación con HyA, que fue la fracción que menos suprimió la síntesis de esta citoquina. No obstante, en este caso la prueba t de Student no evidenció diferencias entre los distintos antígenos.

Tabla 4.4. Comparación del efecto de los distintos antígenos de *H. lineatum* en cultivos de CMSP de animales sensibilizados (* nivel de significación $p \leq 0,05$)

Prueba t de Student para muestras dependientes (p)				
	HyA	HyB	HyC	ET
CEL	0,030*	0,044*	0,045*	0,030*
HyA		0,095	0,108	0,065
HyB			0,650	0,325
HyC				0,276

La actividad inmunosupresora de las hipoderminas A y B ya fue señalada por Boulard y Bencharif (1984), al demostrar el efecto inhibidor de estas proteínas sobre el complemento hemolítico bovino.

Al añadir **fitohemaglutinina** a los cultivos se observó de nuevo un descenso en los niveles de IFN- γ en los sobrenadantes (Figura 4.14) de los cultivos coincubados con los antígenos parasitarios. En este caso, la HyB produjo la mayor caída de los niveles de esta citoquina.

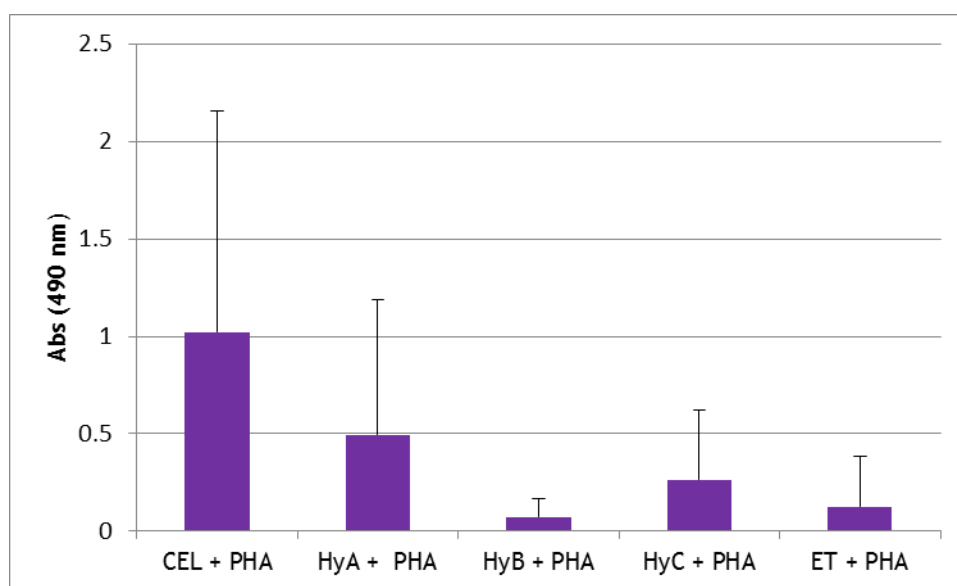


Figura 4.14. Niveles de IFN- γ en sobrenadantes de cultivos de CMSP de animales sensibilizados tras la estimulación con mitógeno y antígenos de *H. lineatum*

Como se puede apreciar en la tabla 4.5, el descenso de los valores de IFN- γ en los pocillos con antígeno no fue significativo al compararlos con los niveles de esta citoquina en los pocillos no estimulados con antígeno. Solamente se observaron diferencias estadísticamente significativas al comparar los niveles de IFN- γ en los pocillos incubados con HyC y con ET.

Tabla 4.5. Comparación del efecto de los antígenos de *H. lineatum* en sobrenadantes de CMSP de animales sensibilizados tras la estimulación con mitógeno (* nivel de significación $p \leq 0,05$)

Prueba t de Student para muestras dependientes (<i>p</i>)				
	HyA + PHA	HyB + PHA	HyC + PHA	ET + PHA
CEL + PHA	0,192	0,151	0,160	0,131
HyA + PHA		0,271	0,277	0,134
HyB + PHA			0,271	0,928
HyC + PHA				0,049*

Estos resultados coinciden con los de Chabaudie y Boulard (1993), quienes demostraron que la HyC provoca una disminución dosis-dependiente de la respuesta inducida por la PHA, postulando que dicho efecto modulador se deba a la competición de ambas por un receptor específico linfocitario. Por otro lado, Dacal (2006) comprobó que las CMSP de animales positivos incubadas con ET responden a la actividad mitogénica de la PHA con valores crecientes a medida que aumenta la concentración de mitógeno.

Al comparar el efecto de los antígenos en los cultivos estimulados y no estimulados con mitógeno (Figura 4.15), se observa que la adición de fitohemaglutinina a los cultivos produjo un aumento en los niveles de IFN- γ en los sobrenadantes celulares en relación a los producidos de forma espontánea por parte de las células.

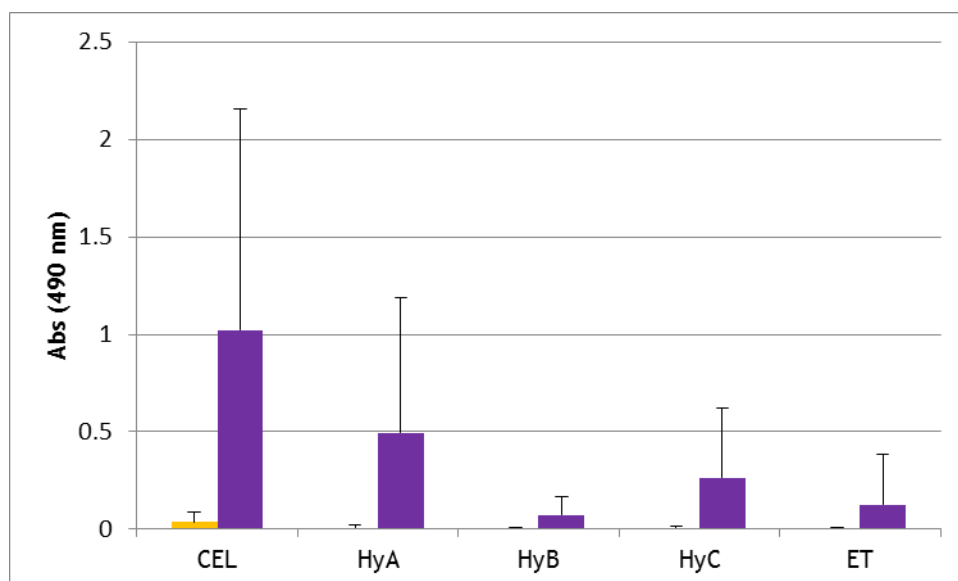


Figura 4.15. Comparación de los niveles de IFN- γ en cultivos de CMSP de animales sensibilizados tras la estimulación con mitógeno y/o distintos antígenos de *H. lineatum*

No obstante, la prueba t de Student para muestras dependientes no indicó que el incremento fuera significativo en ninguno de los casos (Tabla 4.6).

Tabla 4.6. Comparación del efecto de los antígenos de *H. lineatum* en sobrenadantes de CMSP de animales sensibilizados en presencia y ausencia de mitógeno (* nivel de significación $p \leq 0,05$)

Prueba t de Student para muestras dependientes	
CEL x CEL + PHA	0,166
HyA x HyA + PHA	0,219
HyB x HyB + PHA	0,084
HyC x HyC + PHA	0,138
ET x ET + PHA	0,382

A diferencia de nuestros resultados, Panadero *et al.* (2009), en cultivos de linfocitos de vacas infestadas por *Hypoderma*, observaron que la incubación con el antígeno larvario hipodermina A producía una elevación significativa en los niveles de

IFN- γ y una supresión de los niveles de IL-10, lo que indicaría una respuesta de tipo Th1. Este balance indicaría la estimulación de una respuesta celular que actuaría destruyendo a las larvas.

4.3.2.3. Comparación de la respuesta en animales sensibilizados y no sensibilizados

En la figura 4.16 aparece representado el efecto de la estimulación *in vitro* con los diferentes antígenos de *Hypoderma* en la producción de IFN- γ por parte de CMSP de animales no sensibilizados y previamente sensibilizados.

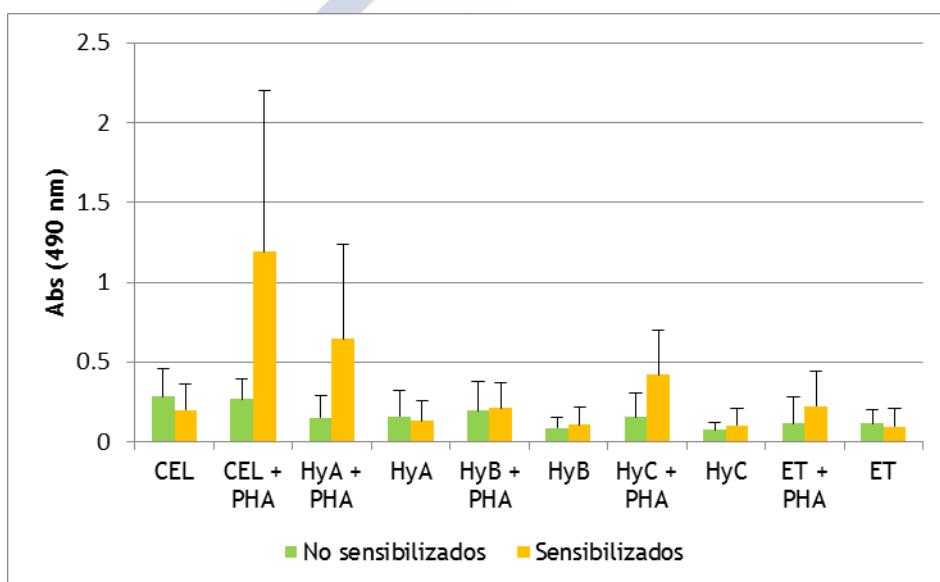


Figura 4.16. Comparación de los niveles de IFN- γ en sobrenadantes de cultivos de CMSP de animales no sensibilizados y sensibilizados tras la estimulación con mitógeno y/o distintos antígenos de *H. lineatum*

Cabe destacar en este apartado el hecho de que las CMSP de los animales previamente sensibilizados parecen reaccionar de forma más intensa a la fitohemaglutinina, existiendo mayores diferencias entre los pocillos con y sin mitógeno que en el caso de los animales no sensibilizados.

A la vista de los resultados obtenidos, podemos afirmar que la presencia *in vitro* de los distintos antígenos de larvas de *Hypoderma* disminuye la secreción de IFN- γ por los linfocitos procedentes de animales sin infestar ni por los infestados, resultando en este último caso las diferencias significativas.

Mientras que el mayor efecto inmunosupresor en animales no sensibilizados fue causado por la HyB, en los animales previamente sensibilizados, el mayor descenso de los niveles de IFN- γ lo produjo la incubación con ET.

La presencia del antígeno bruto integrado por las 3 hipodermas provoca un efecto inhibitor tanto en cultivos de animales positivos como negativos, lo que contribuiría ciertamente a inhibir o atenuar la reacción frente al parásito y, por tanto, a favorecer la supervivencia de las larvas en el hospedador.

Tabla 4.7. Comparación de los niveles de IFN- γ en cultivos de animales sensibilizados y no sensibilizados frente a *Hypoderma* sp. (*nivel de significación $p \leq 0,05$)

Prueba t de Student para muestras independientes (p)	
CEL	0,739
CEL + PHA	0,152
HyA + PHA	0,189
HyA	0,811
HyB + PHA	0,909
HyB	0,757
HyC + PHA	0,145
HyC	0,622
ET + PHA	0,457
ET	0,796

A pesar de las diferencias encontradas en la respuesta de los cultivos procedentes de animales positivos y negativos, la prueba t de Student para muestras independientes no demostró diferencias significativas entre ambos grupos.

De acuerdo con Baron y Weintraub (1987), el ganado expuesto repetidamente a la infestación por *Hypoderma* presenta una cierta protección, que se manifiesta por el desarrollo de un menor número de barroos en el dorso, lo que se relaciona con una respuesta celular más intensa. Estos animales resistentes presentaron una mayor respuesta a los antígenos y a los mitógenos ConA y PWM.





**5. CAPITULO III. EFECTO REGULADOR DE LAS
CITOQUINAS SOBRE LA RESPUESTA CELULAR
FRENTE A ANTÍGENOS DE *H. lineatum***



5. CAPÍTULO III. EFECTO REGULADOR DE LAS CITOQUINAS SOBRE LA RESPUESTA CELULAR FRENTE A ANTÍGENOS DE *H. lineatum*

5.1. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Las citoquinas son los principales reguladores de la respuesta inmunitaria frente a parásitos, siendo responsables en muchos casos de la patogenia asociada a la infección (Pfaff *et al.*, 2003). A pesar de que la respuesta inmunitaria a un determinado patógeno o antígeno suele ser heterogénea, la polarización hacia respuesta Th1 o Th2 es frecuente (Ouaissi, 2007). En este sentido, el IFN- γ y la IL-4 desempeñan un papel fundamental en la respuesta celular y humoral, respectivamente. La IL-10, por su parte, producida por diferentes células, es una citoquina con un efecto inmunoregulator muy potente (Sher *et al.*, 1992). Así, el desarrollo de una infección parasitaria depende, en último término, del balance entre las propiedades protectoras y patogénicas del conjunto de citoquinas (Brown *et al.*, 1998).

Las secreciones larvarias de *Hypoderma* spp. están constituidas por tres antígenos fundamentales (hipodermina A, B y C) implicados en la modulación de la respuesta inflamatoria y defensiva frente al parásito. Dicho efecto contribuye a la supervivencia de las larvas en el proceso de migración hacia el dorso, especialmente evidente en el caso de primoinfestaciones (Moiré *et al.*, 1997). En los animales previamente infectados existe una respuesta celular frente a estos antígenos, con el resultado de destrucción de numerosas larvas de primer estadio. Esta resistencia adquirida contribuye enormemente al control del parásito y depende de la edad del hospedador y de la intensidad de infección (Baron y Weintraub, 1987).

A este respecto, la respuesta inmunitaria en la hipodermosis ha sido ampliamente estudiada, tanto a nivel local como sistémico. Así, el patrón de citoquinas y las poblaciones celulares presentes en la piel de animales primoinfectados sugieren que en las primeras fases de la infestación por *Hypoderma*, el desarrollo de la respuesta celular se ve limitado por los antígenos del parásito, de forma que un mayor número de larvas son capaces de completar el ciclo (López *et al.*, 2005; Dacal *et al.*, 2009). Más

adelante, Vázquez *et al.* (2012) sugirieron un desarrollo secuencial de las respuestas Th1 y Th2 en animales primoinfectados. La respuesta de tipo celular predominante en fases tempranas, caracterizada por altos niveles de IgG2 e IFN- γ , da paso a una respuesta de tipo humoral, con predominio de IgG1 e IL-4.

Panadero *et al.* (2009), señalaron que el efecto inmunomodulador de las secreciones de *H. lineatum in vitro* es más intenso en células mononucleares de animales no sensibilizados con respecto a los sensibilizados. Estos autores observaron una marcada supresión de la respuesta linfoproliferativa y de la producción de IL-10, IL-4 e IFN- γ en cultivos estimulados con los antígenos parasitarios. Así, la HyA fue la fracción con mayor efecto inmunosupresor.

Teniendo en cuenta estas consideraciones, se plantea un ensayo *in vitro* encaminado a profundizar en el conocimiento del efecto inmunomodulador de los distintos antígenos larvarios en animales primoinfectados, y orientado hacia la consecución de los siguientes **objetivos específicos**:

1.- Determinar el efecto regulador del IFN- γ y la IL-4 en la respuesta proliferativa frente a los antígenos de *H. lineatum* en ausencia y presencia del mitógeno concanavalina A en cultivos de células mononucleares de sangre periférica.

2.- Establecer el efecto de estas citoquinas en la secreción de IL-10 en cultivos de células mononucleares de sangre periférica estimulados con los antígenos del parásito.

5.2. MATERIAL Y MÉTODOS

5.2.1. ANIMALES Y AISLAMIENTO DE CMSP

En este ensayo, se emplearon dos terneros de entre 8 y 9 meses como donantes de células no sensibilizadas. Estos animales nunca habían salido al pasto, de forma que no habían tenido contacto con el parásito.

Se tomaron muestras de sangre de la vena yugular en tubos con heparina de litio. Para el aislamiento celular se emplearon 4 ml de sangre que se depositaron cuidadosamente sobre 6 ml de solución de Ficoll (Biochrome AG). A continuación, los tubos se centrifugaron a 700 x g durante 30 minutos a temperatura ambiente. Tras la centrifugación, se recuperaron las CMSP y se lavaron dos veces con tampón PBS pH 7,5. Seguidamente, se realizó el recuento en cámara de Neubauer y se ajustó la concentración a 5×10^6 células/ml para la prueba de linfoproliferación. Asimismo, la concentración celular se ajustó a 1×10^6 células/ml para el ensayo de producción de citoquinas en medio completo con la siguiente composición: RPMI 1640, 10% de suero fetal bovino, 100 UI/ml de penicilina, 20 µg/ml de estreptomicina y 1 µg/ml de anfotericina B. La viabilidad de las células se valoró por el método del Azul Trypan.

5.2.2. PREPARACIÓN DEL MITÓGENO Y ANTÍGENOS

El mitógeno empleado en la estimulación de las CMSP fue la concanavalina A (ConA, Biochrome AG) a la concentración de 10 µg/ml para la prueba de linfoproliferación y a 15 µg/ml para la estimulación de la producción de citoquinas. Estas concentraciones habían sido determinadas en ensayos previos.

Los antígenos se prepararon a partir de larvas 1 de *H. lineatum* procedentes del esófago de ganado infectado de forma natural, tal y como se describe en el capítulo anterior.

5.2.3. LINFOPROLIFERACIÓN

La proliferación de células T se analizó mediante un inmunoensayo colorimétrico basado en la medición de la 5-bromo-2'-desoxiuridina (BrdU) incorporada durante la síntesis de ADN (Roche Diagnostics GmbH), siguiendo las instrucciones recomendadas por el fabricante. En este ensayo el desarrollo de color y, por lo tanto, los valores de absorbancia están directamente correlacionados con la cantidad de ADN de nueva síntesis y por ende con el número de células proliferativas en los respectivos microcultivos. El ensayo de linfoproliferación constó de las siguientes fases:

1.- Cultivos celulares. Las CMSP aisladas de cada animal se cultivaron por triplicado en placas de 96 pocillos (Costar) a la concentración de 5×10^5 /pocillo. Las células se estimularon con ConA a la concentración de 10 $\mu\text{g/ml}$ y/o 100 $\mu\text{g/ml}$ del antígeno correspondiente, así como la citoquina exógena de interés (IFN- γ recombinante bovino a 0,2 ng/ml e IL-4 recombinante a 0,1 ng/ml, Serotec). Igualmente, se incluyeron pocillos control sin mitógeno. Los cultivos se incubaron a 37°C en una atmósfera del 5% de CO₂ durante 48 horas.

2.- Incorporación de la BrdU al ADN celular; a continuación se incubaron durante 24 horas con 110 μg /pocillo de BrdU. Durante este periodo la BrdU, que es un análogo pirimidina, se incorpora en lugar de la timidina en el ADN de nueva síntesis de las células linfoproliferativas.

3.- Fijación y desnaturalización: posteriormente las placas se centrifugaron a 300 x g durante 10 minutos, eliminando todo el medio de cultivo por aspiración cuidadosa de cada pocillo y se dejaron desecar las células a 60°C durante 2 horas. A continuación se añadieron 200 μl /pocillo de etanol ácido al 70% (0,5M HCl) y se incubaron 30 minutos a 20°C. Finalmente, se lavaron 3 veces con PBS (pH 7,2) suplementado con BSA al 10%.

4.- Incubación con un anticuerpo anti- BrdU marcado con peroxidasa: se añadieron 100 μl /pocillo del conjugado a una dilución 1:100 y se incubaron durante 30 minutos a 20°C. Finalmente se eliminó el conjugado mediante 3 lavados con 200 μl de solución de lavado.

5.- Adición de sustrato y revelado de la reacción: se añadieron 100 μl /pocillo de una solución de sustrato y se incubó a temperatura ambiente durante 15-20 minutos. Se detuvo la reacción con 25 μl /pocillo de H₂SO₄ 1M. Finalmente se leyeron las DO a 450 nm.

El índice de estimulación (IE) se calculó como el ratio de absorbancia del control y de las células estimuladas: $IE = E/C$, donde E es el valor de absorbancia para las células estimuladas con antígeno e interleuquina recombinante y C, la absorbancia de las células incubadas con antígeno pero en ausencia de interleuquina exógena.

5.2.4. DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE IL-10 EN EL SOBRENADANTE

Las CMSP se aislaron como se describió anteriormente y su concentración se ajustó a 1×10^6 cel/pocillo. Se cultivaron en placas de 28 pocillos (Costar) y se estimularon como en el punto 2.3. Tras una incubación de 48 horas a 37°C y 5% CO₂, las placas se centrifugaron y los sobrenadantes libres de células se congelaron a -30°C para su análisis posterior. Los niveles de IL-10 se determinaron usando un ELISA sándwich descrito por Panadero *et al.* (2009).

5.2.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

El análisis estadístico se realizó con el paquete estadístico R. El análisis de muestras relacionadas se realizó con la prueba t de Student. Asimismo, el test ANOVA se empleó para comparar los dos grupos. Los resultados se consideraron significativos cuando p era inferior a 0,05.

5.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.3.1. LINFOPROLIFERACIÓN

En la Figura 5.1, se muestra el efecto del IFN- γ y la IL-4 recombinante en la respuesta proliferativa de las CMSP tras la estimulación con los diferentes antígenos de *H. lineatum*, en presencia o ausencia del mitógeno ConA. Los resultados reflejan la media de las absorbancias y desviaciones estándar.

En general, la adición de citoquina exógena no produjo variaciones significativas en la respuesta linfoproliferativa ($p > 0,05$), excepto en las células estimuladas con ConA, en las que la adición de IL-4 en ausencia de antígenos induce una supresión de la respuesta linfoproliferativa con respecto a los pocillos control y los que contenían IFN- γ exógeno.

La incubación de las CMSP con los diferentes antígenos de *H. lineatum* en ausencia o presencia de ConA indujo una reducción significativa de la respuesta linfoproliferativa ($p < 0,05$). Esta reducción siguió siendo significativa tras la adición del IFN- γ y la IL-4. Estos resultados concuerdan con los de otros autores, que pusieron en evidencia el efecto inmunosupresor *in vitro* de los antígenos de *Hypoderma* (Chabaudie y Boulard, 1992; Moiré *et al.*, 1997; Panadero *et al.*, 2009). Este efecto es especialmente importante en los animales no sensibilizados en comparación a los previamente sensibilizados (Panadero *et al.*, 2009). A pesar de que los mecanismos subyacentes a esta respuesta no se han dilucidado completamente, el acusado efecto de los antígenos sobre células no sensibilizadas sugiere que las larvas están específicamente adaptadas al hospedador tanto en la hipodermosis como en otras miasis (Otranto, 2001).

Las secreciones larvarias de *Hypoderma* están compuestas por tres serin-proteasas, que individualmente inducen respuestas diferentes y que se solapan parcialmente en la modulación de la respuesta inmunitaria.

En este caso, no se encontraron diferencias significativas entre los distintos antígenos ($p > 0,05$). Debido a su papel inmunosupresor, trabajos recientes han señalado la utilidad de las distintas fracciones antigénicas como inhibidores del rechazo en xenotransplantes, concretamente de la HyA (Malassagne *et al.*, 2003 y Chen *et al.*, 2014) y la HyC (Hu *et al.*, 2014).

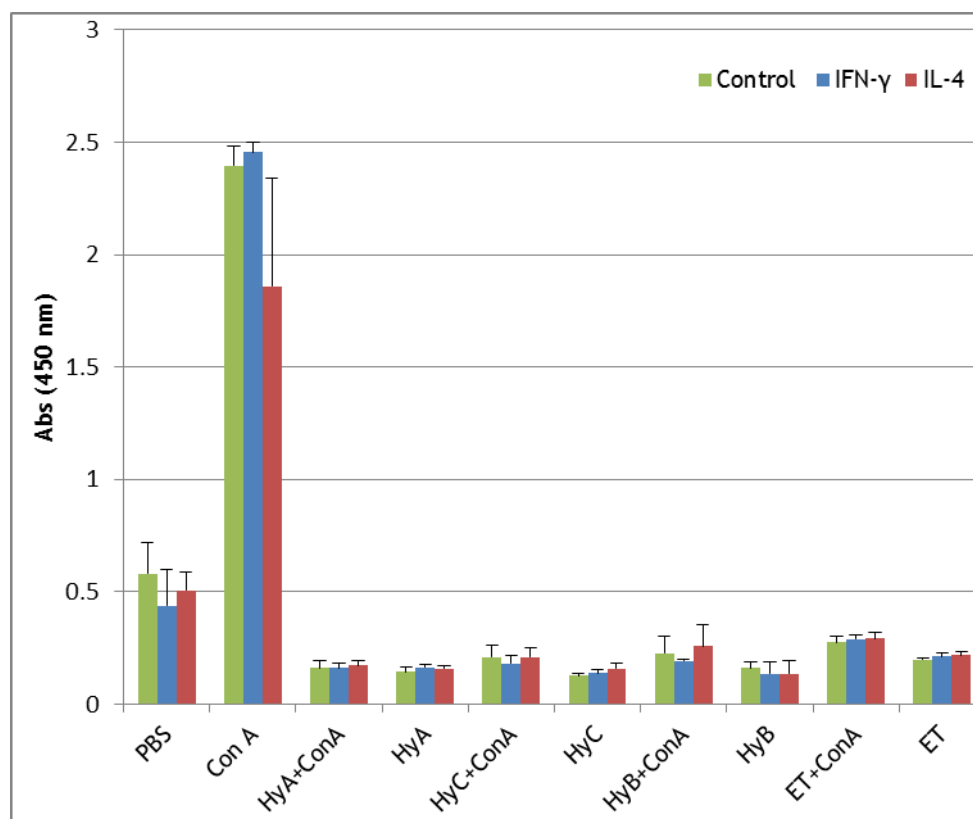


Figura 5.1. Respuesta linfoproliferativa antígeno-específica en cultivos de CMSP de terneros no sensibilizados frente a *H. lineatum* coestimulados con IFN- γ e IL-4 exógenos y/o el mitógeno ConA

En la Figura 5.2 se recoge el efecto de las citoquinas exógenas sobre el índice de estimulación del mitógeno ConA en presencia de los diferentes antígenos. La adición del IFN- γ rbov tuvo un efecto inhibitor sobre la respuesta linfoproliferativa en los cultivos coincubados con HyB e HyC, con diferencias significativas entre el índice de estimulación de los cultivos incubados con HyB y los que contenían extracto total ($p < 0,05$). En este sentido, Panadero *et al.* (2009) señalaron diferencias significativas entre las fracciones antigénicas y el extracto total.

En lo que respecta a la IL-4rbov, si bien se observó un ligero efecto estimulador sobre la respuesta linfoproliferativa, la adición de esta citoquina no alteró de forma significativa el índice de estimulación del mitógeno ConA, independientemente del antígeno ($p > 0,05$).

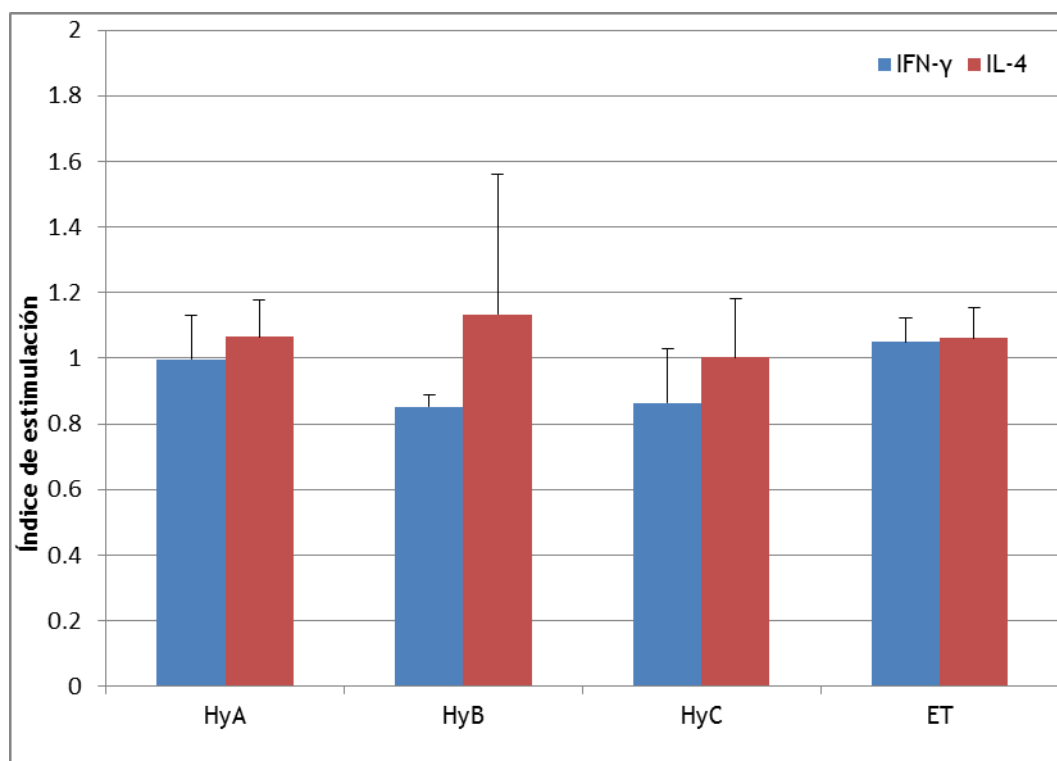


Figura 5.2. Respuesta linfoproliferativa inducida por el mitógeno ConA en cultivos de CMSP de terneros no sensibilizados frente a *H. lineatum* estimulados con IFN- γ e IL-4 exógenos y con 100 μ g/ml de extracto total (ET) y de las hipodermis A, B y C

5.3.2. PRODUCCIÓN DE IL-10

En la Figura 5.3, se muestra el efecto del IFN- γ y la IL-4 exógenos sobre la producción de IL-10 por parte de las CMSP coincubadas con ConA y/o los diferentes antígenos de *Hypoderma*. Se observa que la liberación espontánea de IL-10 en los cultivos control en ausencia de mitógeno y antígeno fue relativamente alta; sin embargo, la adición de IFN- γ e IL-4 exógenos indujo un ligero descenso en la producción de esta citoquina.

La incubación con ConA apenas afectó a la liberación de IL-10. La adición de los distintos antígenos, sin embargo, produjo un descenso marcado de los niveles de IL-10. Este hecho parece oponerse al papel de IL-10 como limitador de la inflamación y facilitador de la persistencia larvaria (Trinchieri, 2001). Sin embargo, bajo ciertas circunstancias, la IL-10 participa en la eliminación de partículas infecciosas y no

infecciosas, siendo la inflamación limitada (Ding *et al.*, 2000). En nuestro estudio, la reducción de los niveles de IL-10 podría estar asociada, en parte, al efecto de los antígenos sobre la linfoproliferación. De esta forma, la disminución de la proliferación celular podría ir acompañada de un descenso de los niveles de IL-10.

En las infestaciones por helmintos, al igual que en la hipodermosis, los parásitos liberan compuestos inmunosupresores para asegurar su supervivencia. Sin embargo, en contraste con nuestros resultados, en las helmintosis estos productos son responsables de inhibir la respuesta linfoproliferativa debido al incremento en la producción de IL-10 (Maizels y Yazdanbaakhsh, 2003).

La suplementación exógena con IFN- γ e IL-4 no produjo, en general, cambios notables en los niveles de IL-10, salvo en los sobrenadantes de los cultivos estimulados con HyB, donde se hallaron mayores proporciones de esta citoquina tras la adición de IL-4 (Figura 5.3).

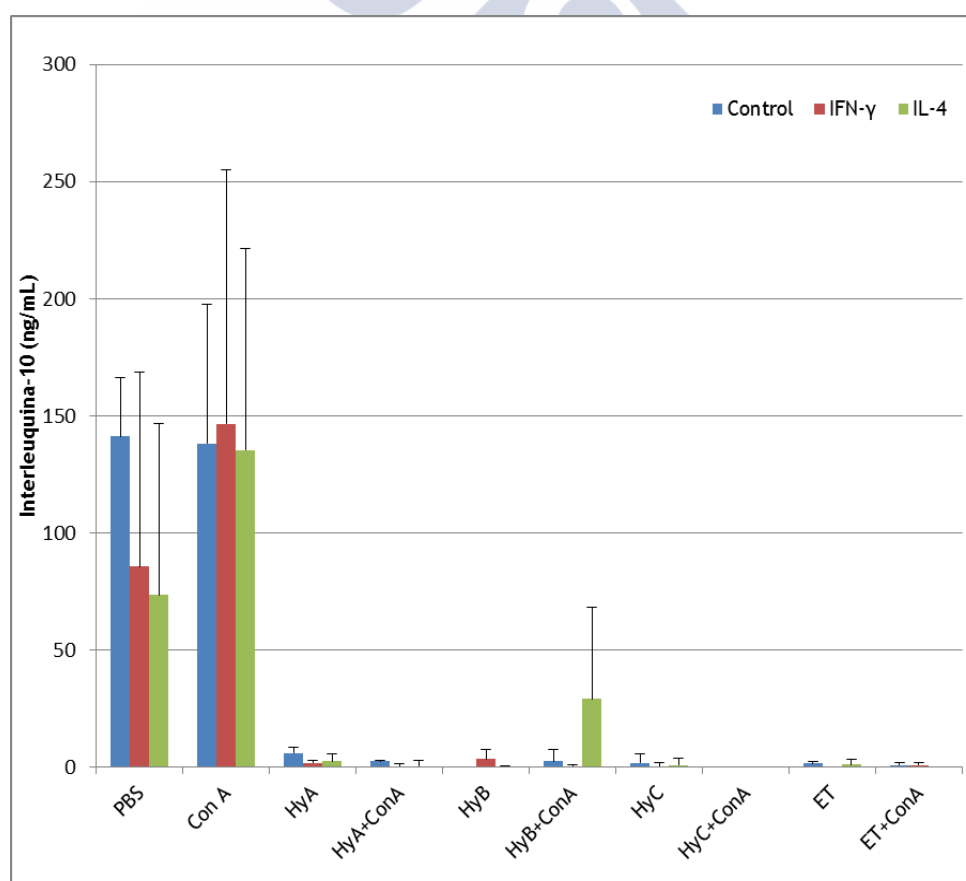


Figura 5.3. Niveles de IL-10 en sobrenadantes de cultivos de CMSP de animales no sensibilizados frente a *H. lineatum* coincubados con IFN- γ e IL-4 y estimulados con 100 μ g/ml de ET y de las hipoderminas A, B y C





6. CAPITULO IV. DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE CITOQUINAS MEDIANTE RT-qPCR



6. CAPÍTULO IV. DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE CITOQUINAS MEDIANTE RT-qPCR

6.1. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS ESPECÍFICOS

En los últimos años, el desarrollo de la PCR a tiempo real y de la PCR con transcriptasa inversa (RT-PCR) han revolucionado la detección de la expresión de genes en modelos animales. Esta técnica cuenta con muchas ventajas sobre otros métodos para cuantificar la expresión genética. Así, la RT-qPCR permite discriminar ARN con secuencias prácticamente idénticas, requiere una cantidad de muestra mucho menor que otros métodos y posee un bajo coeficiente de variación (Wong y Medrano, 2005). Por estos motivos, la RT-qPCR constituye actualmente el método de elección para el estudio de la expresión de citoquinas en rumiantes. Sin embargo, a pesar de que existen numerosos trabajos en lo que concierne a agentes infecciosos (Konnai *et al.*, 2003, Peli *et al.*, 2003; Coussens *et al.*, 2004; Zaros *et al.*, 2007; González *et al.*, 2013), en el caso de los parásitos son todavía muy escasos y se limitan en su mayoría al estudio de infestaciones por garrapatas (Brake y De León, 2012; Domingues *et al.*, 2014). Por otra parte, existe notable controversia sobre la existencia de una posible correlación entre los resultados obtenidos con diversas técnicas para la detección de citoquinas en ganado vacuno (Favre *et al.*, 1997, Mena *et al.*, 2002, Díaz y Mateu, 2005, Singh *et al.* 2011).

Dado que en capítulos anteriores, se ha estudiado el efecto de los distintos antígenos de *Hypoderma* sobre la secreción de citoquinas por parte de CMSP de ganado vacuno mediante ELISA y ELISPOT, en este capítulo pondremos a punto y emplearemos la RT-qPCR, que pondremos a punto para estudiar el patrón de expresión de las mismas y, en su caso, investigar posibles correspondencias entre ambas técnicas.

Teniendo en cuenta estas consideraciones, planteamos en este apartado, los siguientes **OBJETIVOS**:

1º.- Estudiar el efecto de las hipoderminas A, B y C, así como del antígeno bruto (ET) sobre la expresión de las citoquinas IFN- γ , IL-10, IL-4 y TNF- α .

2º.- Demostrar la influencia del tiempo de incubación en los niveles de expresión de las distintas citoquinas incluidas en el estudio.

3º.- Comparar los patrones de expresión de las distintas citoquinas en cultivos de linfocitos de bovinos previamente infestados y no infestados por *Hypoderma*.

4º.- Comparar los resultados de la RT-qPCR con los del ELISA en relación a la detección de citoquinas en cultivos de CMSP de ganado vacuno.

6.2. MATERIAL Y MÉTODOS

6.2.1. ANIMALES DONANTES Y CULTIVOS CELULARES

Como donantes de CMSP no sensibilizadas frente a *Hypoderma*, se emplearon 6 terneros de entre 3 y 6 meses de edad, procedentes de distintas explotaciones de la provincia de Lugo y que no habían tenido contacto previo con el parásito. Como donantes de CMSP previamente sensibilizadas, se utilizaron 6 vacas procedentes de una granja de la provincia de Pontevedra, que habían presentado nódulos larvarios de *Hypoderma* sp. en el dorso la temporada anterior.

Las muestras de sangre (30-50 ml/animal) se obtuvieron de la vena caudal empleando tubos Vacutainer® de 10 ml con heparina de litio, que se invirtieron varias veces para asegurar que la sangre se mezclase completamente con el anticoagulante. Los tubos se transportaron inmediatamente al laboratorio y se mantuvieron en agitación a temperatura ambiente hasta su procesado que se llevó a cabo lo antes posible.

La sangre se distribuyó en tubos de 50 ml, que se centrifugaron a 1000 x g durante 20 minutos a temperatura ambiente. Tras la centrifugación, se recuperó la capa leuco-plaquetaria o “buffy coat” en una botella de cristal de 100 ml previamente esterilizada. A continuación, se le añadió igual volumen de solución de lavado PBS/EDTA (1mM), preparada a partir de agua destilada, PBS concentrado comercial (Gibco, Life technologies) y EDTA (Ultrapure 0.5 M EDTA, pH 8.0. Thermofisher).

De forma paralela, se añadieron 15 ml de Ficoll (BIOCOLL[®], Biochrom AG) con una densidad específica de 1,077 g/ml a tubos Accuspin[®] (Sigma-Aldrich) de 50 ml y se realizó un spin para llevar el Ficoll al fondo. Posteriormente, se añadieron 25 ml de la capa leuco-plaquetaria diluida en PBS/EDTA a cada tubo, con la precaución de no atravesar el filtro. Los tubos se centrifugaron a 800 x g durante 25 minutos. Se recogieron los anillos de CMSP de cada animal en una botella estéril para homogeneizarlos y se distribuyó un volumen de entre 5 y 10 ml en tubos de 50 ml que se rellenaron con solución de lavado PBS/EDTA y se centrifugaron a 300 x g durante 10 minutos. Tras la centrifugación, se descartó el sobrenadante y el precipitado del fondo o “pellet” se resuspendió en dos tubos con solución de lavado, que se centrifugaron a 250 x g durante 10 minutos a 4° C. Finalmente, se reunieron todos los precipitados de un mismo animal en un único tubo y se realizó un último lavado a 350 x g durante 10 minutos, se eliminó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en 3 ml de solución de lavado.

El recuento de las células se realizó en cámara de Neubauer y su viabilidad se valoró empleando el método del Azul Trypan (Sigma-Aldrich), descrito en el capítulo 2. Las CMSP se sembraron a una concentración de 500.000 células/pocillo en placas de 24 pocillos (Nunc[®]); de modo que a cada pocillo se le añadió el volumen correspondiente de células, los antígenos de *Hypoderma* descritos en el capítulo 2, a la concentración de 100 µg/ml y el mitógeno PHA a 30 µg/ml. El volumen restante hasta 500 µl se completó con medio de cultivo completo con la siguiente composición: RPMI 1640 (Liquid medium with stable glutamine with 2.0 g/l NaHCO₃, Merck Millipore), 10% suero fetal bovino descoplementado por calor y 1% de solución antibiótica de penicilina-estreptomicina 10000 U/ml (Thermofisher).

Para cada animal, se dispusieron tres placas que se incubaron a 37°C en una atmósfera al 5% de CO₂, durante 18, 24 y 48 horas, respectivamente. Después de la incubación, se comprobó la integridad de las células bajo el microscopio para verificar su viabilidad y las placas se centrifugaron a 400 x g a 4° C durante 5 minutos. A continuación, se retiró el sobrenadante de cada pocillo y se añadió 1 ml de NucleoZOL (Macherey-Nagel) para lisar las células. Finalmente, el lisado se transfirió a tubos de 1,5 ml para realizar la extracción inmediata de ARN.

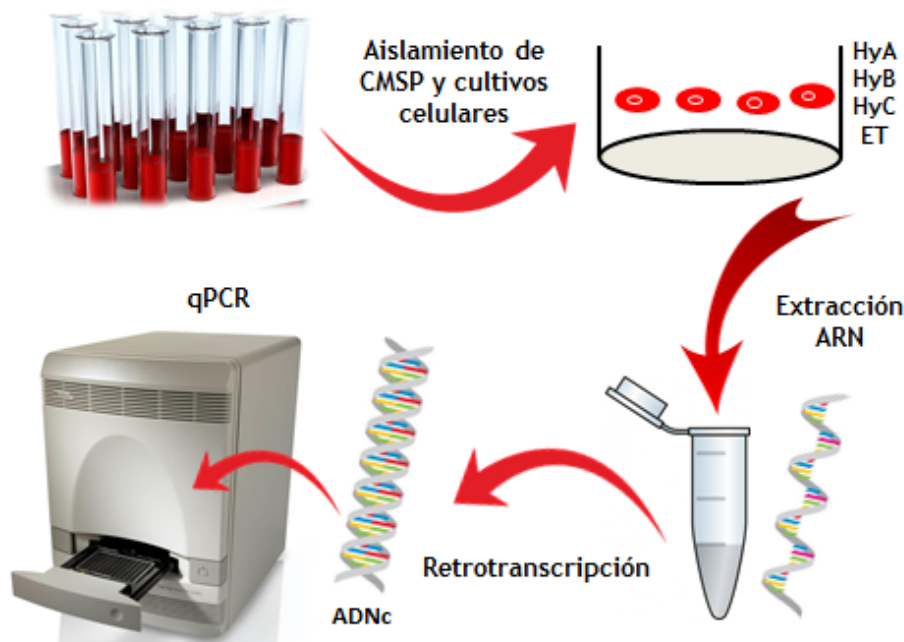


Figura 6.1. Esquema de la técnica de RT-qPCR para la detección de citoquinas

6.2.2. EXTRACCIÓN DE ARN DE LOS CULTIVOS CELULARES

El proceso de extracción de ARN se realizó siguiendo el protocolo del NucleoZOL que se desarrolla en tres etapas:

1ª etapa. Separación de fases: se añadieron 400 µl de agua destilada a cada tubo con el lisado celular. Después de agitarlos vigorosamente durante 15 segundos, se incubaron 10 minutos a temperatura ambiente. Seguidamente, se centrifugaron a 12.000 x g durante 15 minutos. Tras la centrifugación, se obtiene un precipitado de color azul y una fase transparente, en la que se encuentra el ARN. Esta última, se transfirió cuidadosamente a tubos libres de ARNasas.

2ª etapa. Precipitación: se añadió 1 ml de isopropanol 100% a cada muestra y tras una incubación de 10 minutos a temperatura ambiente, las muestras se centrifugaron a 12.000 x g durante 10 minutos.

3ª etapa. Lavado y suspensión del ARN. se eliminó el sobrenadante de cada tubo y se añadieron 500 μ l de etanol 75%. Los tubos se centrifugaron 2 minutos a 8000 x g y se retiró el sobrenadante. Finalmente, el precipitado de ARN se resuspendió en 40 μ l de agua libre de ARNasas (DEPC-treated water, Ambion® The RNA company).

La concentración de ARN de la muestra se midió con un espectrofotómetro Biodrop a 260 nm. La pureza de la muestra se comprobó mediante el ratio de absorbancias A260/A280, considerándose como valores aceptables aquellos inferiores a 1,6.

Finalmente, se procedió a eliminar el ADN que pudiera quedar en las muestras de ARN, para ello, se empleó el kit RNase-Free DNase (Promega, Madison, EE.UU.). Se tomaron 8 μ l de ARN, a los que se le añadió 1 μ l de tampón y 1 μ l de enzima, de forma que el volumen final de la reacción fue de 10 μ l. Las muestras se incubaron en un termobloque a 37°C durante 30 minutos. Después, se añadió 1 μ l de solución de parada a cada muestra y se incubaron de nuevo a 65°C durante 10 minutos para inactivar la enzima. Finalmente, las muestras se congelaron a -80°C hasta su empleo posterior en la RT-qPCR.

6.2.3. RETROTRANSCRIPCIÓN

Para la obtención de la cadena de ADN complementario, se empleó el kit GoScript® Reverse Transcriptase (Promega, Madison, EE.UU.), siendo el volumen total de cada reacción de 40 μ l.

En primer lugar, se preparó la “primer mix” en un volumen total de 10 μ l para cada muestra, en las proporciones referidas en la tabla 6.1.

Tabla 6.1. Componentes de la “primer mix” empleada en la retrotranscripción

Cebadores aleatorios (0,5 μ g/reacción)	2 μ l
ARN (5 μ g/reacción)	8 μ l

A continuación, las muestras se incubaron en termobloque a 70°C durante 5 minutos. Inmediatamente, se introdujeron en hielo durante 5 minutos. Tras una centrifugación de 10 segundos, las muestras se mantuvieron en hielo. Asimismo, se prepararon 30 µl de “RT mix” para cada muestra, con las proporciones que se muestran en la Tabla 6.2.

Tabla 6.2. Componentes de la RT mix empleada en la retrotranscripción

Tampón GoScript	8 µl
MgCl ₂ (1,5 mM)	2,4 µl
dNTPs (0,5 mM)	2 µl
Transcriptasa inversa GoScript	2 µl
Agua libre de nucleasas	15,6 µl

A cada “primer mix”, se le añadieron 30 µl de RT mix y los tubos se introdujeron en el termociclador (MyCycler®, BioRad), al que se aplicó el siguiente protocolo térmico.

- Anillado. 25°C durante 15 minutos
- Extensión. 42°C durante 1 hora
- Inactivación de la enzima. 70°C durante 15 minutos

Finalmente, las muestras de ADN complementario se congelaron a -20° C hasta su empleo.

6.2.5. SELECCIÓN Y PREPARACIÓN DE CEBADORES PARA LAS DISTINTAS CITOQUINAS

Tal y como puede apreciarse en la tabla 6.3, las secuencias de cebadores para las citoquinas incluidas en el estudio se tomaron de la bibliografía y se contrastaron en el GeneBank (NCBI). La elección de los cebadores se basó en el tamaño del amplicón.

En lo que respecta al gen de referencia, se empleó un gen ribosómico 18S, que se mantiene constante y presenta un alto grado de expresión en muestras biológicas (Alves *et al.*, 2009, Mehus *et al.*, 2014).

Tabla 6.3. Cebadores empleados para la detección de citoquinas en ganado vacuno

Gen	Nombre	Secuencia cebador	Longitud amplicón (pb)	Referencia
IFN- γ	S ^a	TGGAGGACTTCAAAAAGCTGATT	67	Coussens <i>et al.</i> (2004)
	AS ^b	TTTATGGCTTTGCGCTGGAT		
IL-4	S	GCCACACGTGCTTGAACAAA	63	Coussens <i>et al.</i> (2004)
	AS	TGCTTGCCAAGCTGTTGAGA		
TNF- α	S	CGGTGGTGGGACTCGTATG	63	Coussens <i>et al.</i> (2004)
	AS	CTGGTTGTCTCCAGCTTCACA		
IL-10	S	CTTGTCGGAATGATCCAGTTTT	66	Coussens <i>et al.</i> (2004)
	AS	TCAGGCCCGTGGTTCTCA		
18S	S	CGCCGCTAGAGGTGAAAATTC	62	Mehus <i>et al.</i> (2014)
	AS	GGCAAATGCTTTCGCTCTG		

^aSentido; ^bAntisentido

Los cebadores se diluyeron a una concentración de 100 μ M que se conservó como stock. A partir de ella, se prepararon alícuotas de trabajo en las que se diluyeron 20 μ l de cada cebador (S y AS) en 160 μ l de agua libre de nucleasas, de forma que la concentración final de los mismos fue de 0,5 μ M.

6.2.6. PCR CUANTITATIVA (qPCR)

Se empleó el kit GoTaq® qPCR Master Mix (Promega, Madison, EE.UU.), que contiene un colorante que se une al ADN, ofreciendo una mejora de la fluorescencia con respecto al método SYBR® Green I; ya que a diferencia de este, apenas inhibe la PCR.

Esta formulación comercial incluye prácticamente todos los componentes para la qPCR, salvo las muestras de ADN, los cebadores y el agua; esto es, un colorante que se une a la doble hélice del ADN, carboxy-X-rhodamina (CXR) -un colorante de referencia idéntico al ROX-, la enzima polimerasa, $MgCl_2$, dNTPs y un tampón. El CXR hace posible una amplificación eficiente, resultando en una temprana detección de ciclos de cuantificación y un mayor rango de detección, usando los mismos filtros y parámetros que el SYBR® Green.

La qPCR se efectuó en placas de 96 pocillos (MicroAmp® Fast Optical 96-Well Reaction Plate with Barcode 0,1 ml, Applied biosystems) con un volumen total de reacción de 25 μ l. A cada pocillo, se añadió 1 μ l de cebadores y 2 μ l de ADNc de la muestra. A continuación, se procedió a la preparación de la mix, siguiendo las instrucciones del fabricante (Tabla 6.4). Así, en cada pocillo, se dispensaron 23 μ l de la mezcla.

Con el objeto de calcular la expresión relativa de cada citoquina, cada muestra se testó por duplicado: para el gen a analizar y para el gen de referencia (18S).

Tabla 6.4. Composición de la mezcla para qPCR

GoTaq® qPCR	12,5 μ l
Agua libre de nucleasas	9,5 μ l
CXR	0,25 μ l

Una vez añadida la mezcla a los pocillos, la placa se cubrió con un plástico adherente y se centrifugó a 1000 x g durante 10 segundos para eliminar las burbujas. A

continuación, se introdujo en el termociclador (Applied Biosystems 7300 Real-Time PCR System) Finalmente, se aplicó el programa standard de dos pasos que se refleja en la Tabla 6.5.

Tabla 6.5. Programa del termociclador para la qPCR

Ciclos		
Activación	1	95° C durante 2 minutos
Desnaturalización	40	95°C durante 3 segundos
Anillado/extensión	-	60°C durante 30 segundos
Disociación	1	60-95° C

Los resultados se analizaron con el software 7500 v.2.0.6 de Applied Biosystems, Los valores de Ct (ciclo umbral) se exportaron a una hoja de cálculo de Excel y se calculó la expresión relativa de cada gen normalizada con respecto al gen de referencia 18S, aplicando la siguiente fórmula $2^{-\Delta C_t}$, donde $\Delta C_t = C_t \text{ gen a analizar} - C_t \text{ gen de referencia}$.

6.2.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Los datos obtenidos en este estudio se procesaron con ayuda de la hoja de cálculo Microsoft Excel 2007 y su análisis estadístico se realizó mediante el programa estadístico R versión 3.1.1.

En el apartado de estadística descriptiva se empleó la media aritmética como indicadores de tendencia y la desviación típica (DE) y error estándar (EE) como medidas de dispersión.

Dado que los datos no se ajustaban a la normalidad, los análisis estadísticos se realizaron sobre el logaritmo de los mismos. Se llevó a cabo un ANOVA multifactorial para ver las diferencias entre las expresiones en función de las variables estudiadas:

grupo (sensibilizados y no sensibilizados), tiempo (18, 22 y 48 horas), antígeno (CEL, ET, HyA, HyB, HyC) y mitógeno (+ PHA y - PHA) y una prueba HSD de Tukey para realizar comparaciones post-hoc por pares entre los grupos formados.

6.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.3.1. INTERFERON GAMMA (IFN- γ)

La media de expresión de esta citoquina en los cultivos realizados fue de $3,30 \times 10^{-4}$ (DE=0,004). En la tabla 6.6 se muestran las medias de los valores de expresión de IFN- γ , en función de los distintos factores considerados en el estudio. Así, la expresión de esta citoquina fue mayor en los animales sensibilizados que en los no sensibilizados. En relación al tiempo de incubación, los niveles de expresión de IFN- γ fueron similares entre las 18 y 24 horas y notablemente mayores a las 48 horas. En los cultivos estimulados con antígeno, se observaron valores más bajos de expresión que en los cultivos no estimulados, siendo los cultivos estimulados con HyA los que presentaron los valores de expresión de IFN- γ más bajos. En cuanto al efecto del mitógeno, en los cultivos estimulados con PHA se observó una mayor expresión del IFN- γ .

Tabla 6.6. Niveles de expresión de IFN- γ en cultivos de CMSP de ganado vacuno estimulados con mitógeno y antígenos de *Hypoderma*

		Media	Error estándar	n= 360
Grupo	No sensibilizados	$5,33 \times 10^{-6}$	$2,0163 \times 10^{-6}$	180
	Sensibilizados	$3,24 \times 10^{-4}$	$1,744 \times 10^{-4}$	180
Tiempo	18 h	$6,41 \times 10^{-5}$	$4,265 \times 10^{-5}$	120
	24 h	$5,91 \times 10^{-5}$	$3,089 \times 10^{-5}$	120
	48 h	$3,71 \times 10^{-4}$	$2,568 \times 10^{-4}$	120
Antígeno	CEL	$4,35 \times 10^{-4}$	$3,997 \times 10^{-4}$	72
	ET	$2,34 \times 10^{-4}$	$1,696 \times 10^{-4}$	72
	HyA	$3,26 \times 10^{-5}$	$1,739 \times 10^{-5}$	72
	HyB	$4,62 \times 10^{-5}$	$2,235 \times 10^{-5}$	72
	HyC	$7,48 \times 10^{-5}$	$4,963 \times 10^{-5}$	72
Mitógeno	- PHA	$1,23 \times 10^{-4}$	$6,600 \times 10^{-5}$	180
	+ PHA	$2,06 \times 10^{-4}$	$1,622 \times 10^{-4}$	180

Como se observa en la tabla 6.7, el análisis multifactorial evidenció diferencias significativas en lo que respecta al grupo, al antígeno empleado y a la interacción grupo/tiempo.

Tabla 6.7. ANOVA multifactorial de los niveles de expresión de IFN- γ en cultivos de CMSP de vacuno

	gl	Suma cuadrados	Valor F	P
Grupo	1	122,8	21.160	<0,001 ***
Tiempo	2	30,4	2.615	0,075 .
Antígeno	4	63,2	2.722	0,029*
Grupo/Tiempo	2	82,5	7.112	<0,001 ***
Residuos	350	2031,0		

Tal y como se ve reflejado en la figura 6.2, los niveles de expresión de ARNm de IFN- γ fueron significativamente superiores en los animales sensibilizados con respecto a los no sensibilizados ($p < 0,001$). Estos resultados concuerdan con lo observado mediante ELISA por Panadero *et al.*, (2009), que detectaron mayores concentraciones de IFN- γ en los sobrenadantes de cultivos de CMSP de animales sensibilizados frente a *Hypoderma* que en los no sensibilizados. Esto mismo ya se

comprobó mediante las técnicas de ELISA y ELISPOT, tal como se expuso en capítulo 2 del presente estudio.

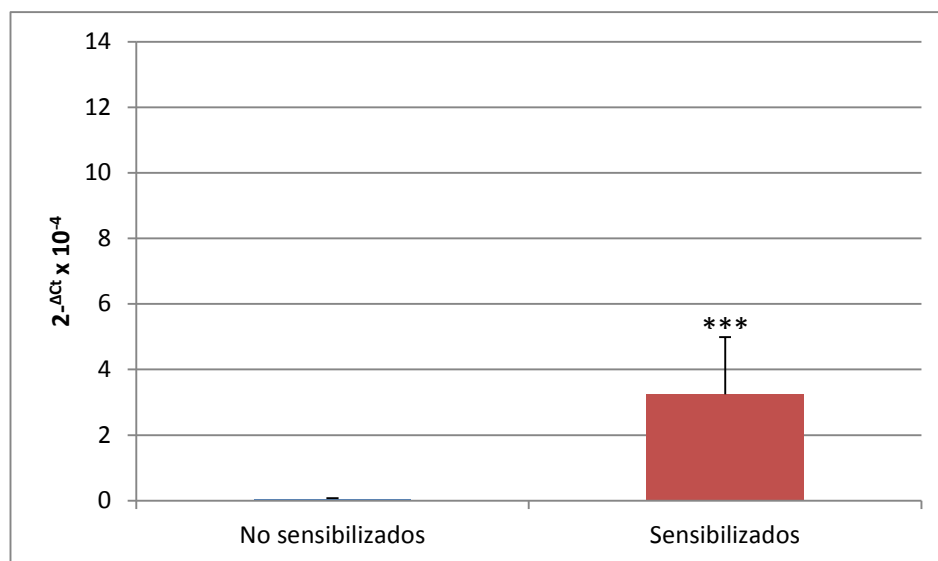


Figura 6.2. Niveles de expresión de IFN- γ en cultivos de CMSP de ganado vacuno estimulados con mitógeno y antígenos de *H. lineatum* (EE, n=180)

En lo que respecta a los distintos antígenos de *Hypoderma*, estos produjeron una disminución de los niveles de expresión de IFN- γ (Figura 6.2.). Este hecho fue señalado anteriormente por Panadero *et al.* (2009), quienes observaron el efecto inmunosupresor de dichos antígenos sobre la secreción de IFN- γ , de modo que puede contribuir a la supervivencia del parásito en animales infestados de forma natural. Por otro lado, como se describe en el capítulo 3 de este estudio, la adición de IFN- γ exógeno a cultivos de CMSP de ganado vacuno previamente estimulados con antígenos de *Hypoderma*, no es capaz de contrarrestar el efecto inmunosupresor de estos.

Así, cuando estos resultados se relacionan con los obtenidos mediante ELISA y ELISPOT que figuran en el capítulo 2, se observa que con las técnicas inmunológicas, es necesario el empleo del mitógeno PHA para amplificar la respuesta celular y posibilitar así la detección de IFN- γ ; sin embargo, con la RT-qPCR no es necesaria esta estimulación, por tratarse de una técnica muy sensible y con un umbral de detección muy bajo (Wong y Medrano, 2005). En todo caso, de acuerdo con nuestros datos, existiría cierta correspondencia entre las distintas técnicas de detección de esta citoquina, como también señalaron Mena *et al.* (2002).

El descenso en la expresión de IFN- γ solo fue significativo en el caso del ET ($p=0,027$). El efecto inmunosupresor de este antígeno demostrado en el capítulo 2, mediante ELISA y ELISPOT, conlleva una disminución significativa de los niveles de esta citoquina en los sobrenadantes de cultivos de CMSP de animales sensibilizados estimulados con ET. Estos resultados vienen a confirmar el efecto inmunosupresor del antígeno larvario total. Por su parte, Panadero *et al.* (2009) observaron un efecto estimulador de la HyA sobre la síntesis de IFN- γ , hecho que no se contó en el presente estudio.

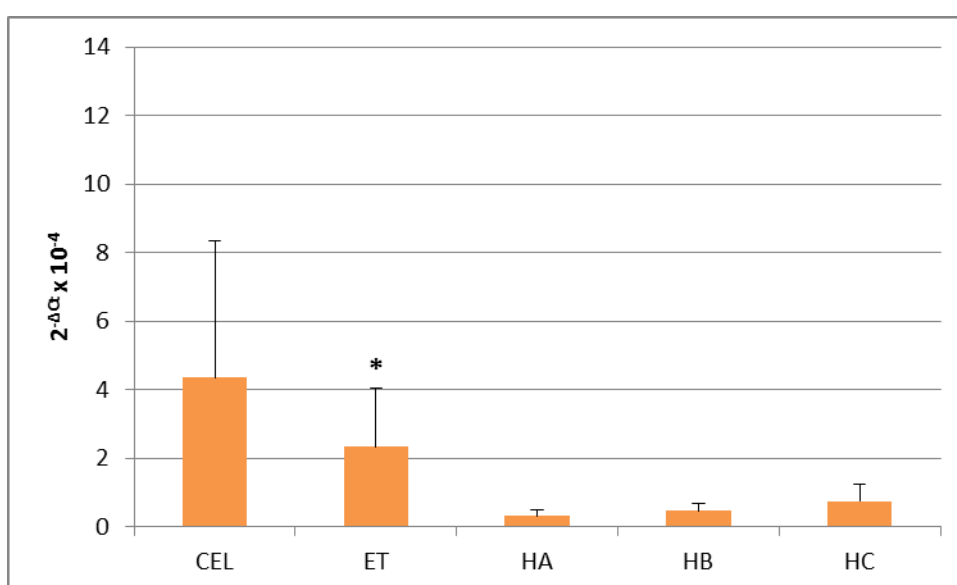


Figura 6.3. Niveles de expresión de IFN- γ en cultivos de CMSP de ganado vacuno estimulados con antígenos e *H. lineatum* (EE, n=72)

Al igual que en el caso de *Hypoderma*, varios autores han demostrado el efecto inhibidor de los antígenos salivales de garrapatas sobre la expresión de IFN- γ , como Ramachandra y Wikel (1992) y Brake y de León (2012), que estimularon CMSP de ganado vacuno con extractos de *Dermacentor andersoni* y *Rhipicephalus microplus*, respectivamente.

Tabla 6.8 Prueba post-hoc por pares TukeyHSD para la expresión de IFN- γ . Asociación grupo/tiempo de cultivo

	Diferencia	P
S:1-NS:1	2,26	< 0,001***
NS:2-NS:1	0,65	0,683
S:2-NS:1	1,97	< 0,001***
NS:3-NS:1	1,85	< 0,001***
S:3-NS:1	1,77	< 0,001***
NS:2-S:1	-1,61	0.004**
S:2-S:1	-0,29	0.986
NS:3-S:1	-0,41	0.940
S:3-S:1	-0,48	0.884
S:2-NS:2	1,32	0.034*
NS:3-NS:2	1,20	0.071
S:3-NS:2	1,13	0.107
NS:3-S:2	-0,12	0.999
S:3-S:2	-0,19	0.998
S:3-NS:3	-0,07	0.999

S (sensibilizados); NS (no sensibilizados); 1 (18h); 2 (24h); 3 (48h)

Con respecto a los distintos tiempos de incubación, se observaron diferencias significativas en la evolución del patrón de expresión del IFN- γ al considerar los dos grupos de animales (Tabla 6.8). En primer lugar, los animales sensibilizados presentaron valores significativamente mayores que los no sensibilizados para los tres tiempos de incubación. Es decir, los animales con contactos previos con el parásito presentaron en todos los casos valores superiores a los no sensibilizados a las 18 e incluso a las 24 horas (S1>NS2, S2>NS2). Por otro lado, la incubación durante 48 h en los no sensibilizados alcanzó un valor significativamente superior al de las 18 h (Figura 6.4). De este modo, en estos animales al aumentar el tiempo de cultivo se observa un incremento en los niveles de expresión de IFN- γ .

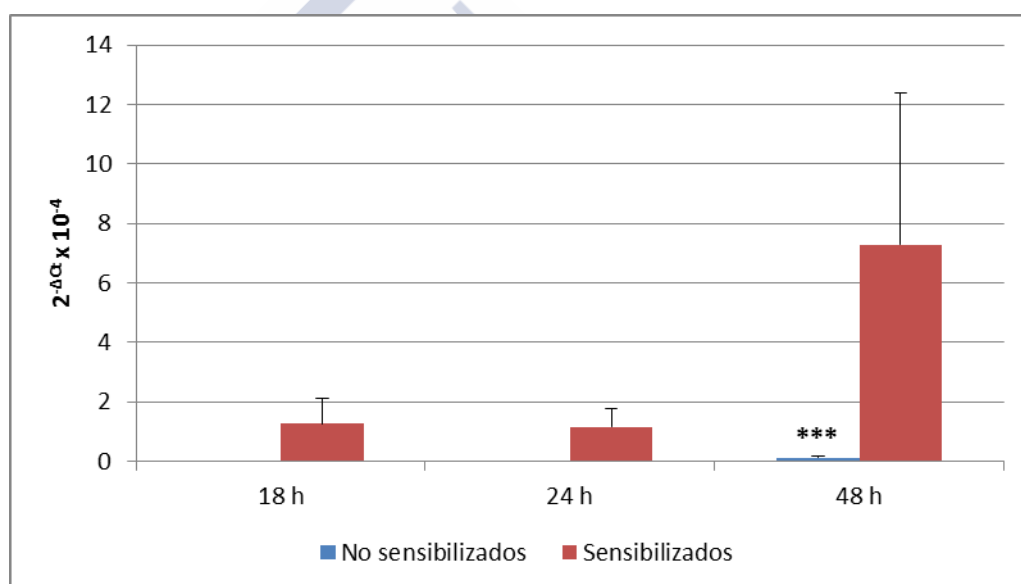


Figura 6.4. Evolución de los niveles de expresión de IFN- γ en cultivos de CMSP de ganado vacuno estimulados con antígenos de *H. lineatum* (EE, n=60)

6.3.2. INTERLEUQUINA 10 (IL-10)

La media de IL-10 obtenida en las células expuestas a diferentes condiciones de cultivo (n=360) fue de $5,95 \times 10^{-5}$ (DE= $4,356 \times 10^{-4}$). Teniendo en cuenta los factores aplicados a la expresión de esta citoquina en los cultivos (Tabla 6.9), se observaron medias más elevadas en los animales sensibilizados con respecto a los que no lo estaban. En cuanto a los tiempos de incubación, los valores medios de expresión se

incrementaron gradualmente desde las 18 hasta las 48 horas. Con respecto a los antígenos, los mejores resultados de expresión correspondieron a los cultivos estimulados con HyC. En los cultivos con mitógeno, se observaron mayores niveles de expresión de IL-10.

Tabla 6.9. Niveles de expresión de IL-10 en cultivos de CMSP de ganado vacuno estimulados con mitógeno y antígenos de *Hypoderma*

		Media	Error estándar	n= 360
Grupo	No sensibilizados	$1,26 \times 10^{-5}$	$3,743 \times 10^{-6}$	180
	Sensibilizados	$1,06 \times 10^{-4}$	$4,556 \times 10^{-5}$	180
Tiempo	18 h	$2,73 \times 10^{-5}$	$7,047 \times 10^{-6}$	120
	24 h	$3,56 \times 10^{-5}$	$2,332 \times 10^{-5}$	120
	48 h	$1,15 \times 10^{-4}$	$6,432 \times 10^{-5}$	120
Antígeno	CEL	$6,98 \times 10^{-5}$	$5,433 \times 10^{-5}$	72
	ET	$4,17 \times 10^{-5}$	$2,530 \times 10^{-5}$	72
	HyA	$1,48 \times 10^{-5}$	$3,600 \times 10^{-6}$	72
	HyB	$2,92 \times 10^{-5}$	$1,035 \times 10^{-5}$	72
	HyC	$1,42 \times 10^{-4}$	$9,731 \times 10^{-5}$	72
Mitógeno	- PHA	$4,41 \times 10^{-5}$	$1,834 \times 10^{-5}$	180
	+ PHA	$7,48 \times 10^{-5}$	$4,213 \times 10^{-5}$	180

Mediante ANOVA multifactorial se observaron diferencias significativas con respecto al tiempo de incubación y al antígeno (Tabla 6.10).

Tabla 6.10. ANOVA multifactorial de los niveles de expresión de IL-10 en cultivos de CMSP de ganado vacuno

	gl	Suma cuadrados	Valor F	P
Grupo	1	9,6	3,300	0,070
Tiempo	2	63,7	10,966	<0,001***
Antígeno	4	30,6	2,631	0,034*
Residuos	350	1022,1		

Tal y como se puede apreciar en la Figura 6.5, los niveles de expresión de IL-10 fueron superiores en los animales sensibilizados con respecto a los no sensibilizados, si bien en este caso, las diferencias no fueron estadísticamente significativas (Tabla 6.10). Esta similitud en la respuesta entre ambos grupos ya fue señalada por Panadero *et al.* (2009), quienes al igual que en nuestro caso, detectaron mayores niveles de secreción de citoquinas en cultivos sensibilizados, si bien tampoco hallaron diferencias significativas entre ambos grupos de animales.

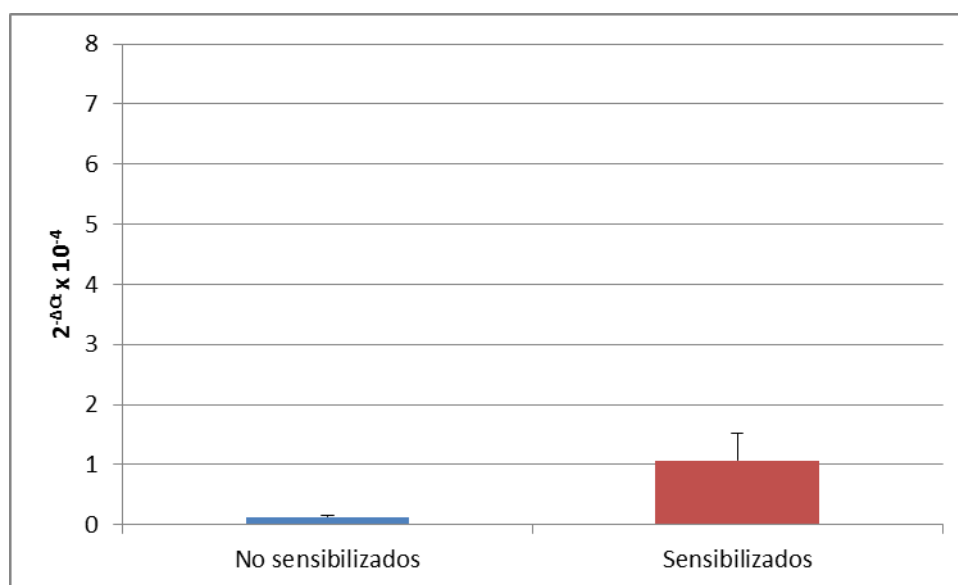


Figura 6.5. Niveles de expresión de IL-10 en cultivos de CMSP de ganado vacuno estimulados con mitógeno y antígenos de *H. lineatum* (EE, n=180)

Tal y como sucedió para el IFN- γ , los distintos antígenos del parásito indujeron un descenso en la expresión de IL-10 (Figura 6.6). Estos resultados concuerdan con los de Panadero *et al.* (2009) quienes observaron una disminución de la secreción de IL-10 en sobrenadantes de cultivos de CMSP de ganado vacuno estimulados con antígenos de *Hypoderma*. De la misma forma, el descenso de los niveles de IL-10 se puso de manifiesto mediante ELISA en el capítulo 3. Por tanto, parece existir un paralelismo entre los resultados de la qRT-PCR y los del ELISA, es decir, entre los niveles de expresión y secreción de IL-10.

El descenso en la expresión de IL-10 resultó significativo únicamente en el caso de la HyB ($p=0,048$). En este sentido, otros autores han señalado el efecto inhibitorio de

la HyB sobre el complemento hemolítico bovino (Boulard y Bencharif, 1984) y la actividad quimiotáctica de los neutrófilos (Chabaudie, 1987; Godon, 1994).

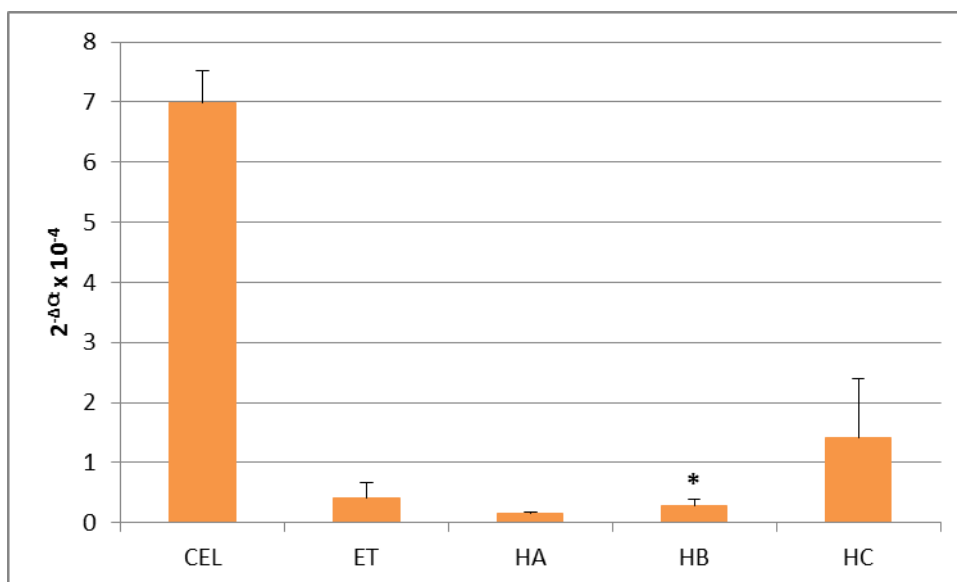


Figura 6.6. Niveles de expresión de IL-10 en cultivos de CMSP de ganado vacuno estimulados con antígenos de *H. lineatum* (EE, n=72)

En cuanto al efecto del tiempo, se observó un incremento paulatino en la expresión de IL-10 (Figura 6.7). Este resultó significativo entre las 18 y 24 horas y las 18 y 48 horas para los no sensibilizados y sensibilizados, respectivamente (Tabla 6.11). Los valores máximos de expresión de esta citoquina corresponden por tanto, a las 48 horas de incubación. Estos resultados concuerdan con los de Domingues *et al.* (2014), que observaron un incremento en la expresión del gen de la IL-10 a las 48 horas en CMSP de vacuno estimuladas con antígenos de *Rhipicephalus microplus*.

Tabla 6.11. Prueba post-hoc de pares TukeyHSD para la expresión de IL-10 teniendo en cuenta el tiempo de cultivo

	Diferencia	P
2-1*	-0,539	0,039*
3-1	-1,030	<0,001***
3-2	-0,491	0,067

*1(18h); 2 (24h); 3 (48h)

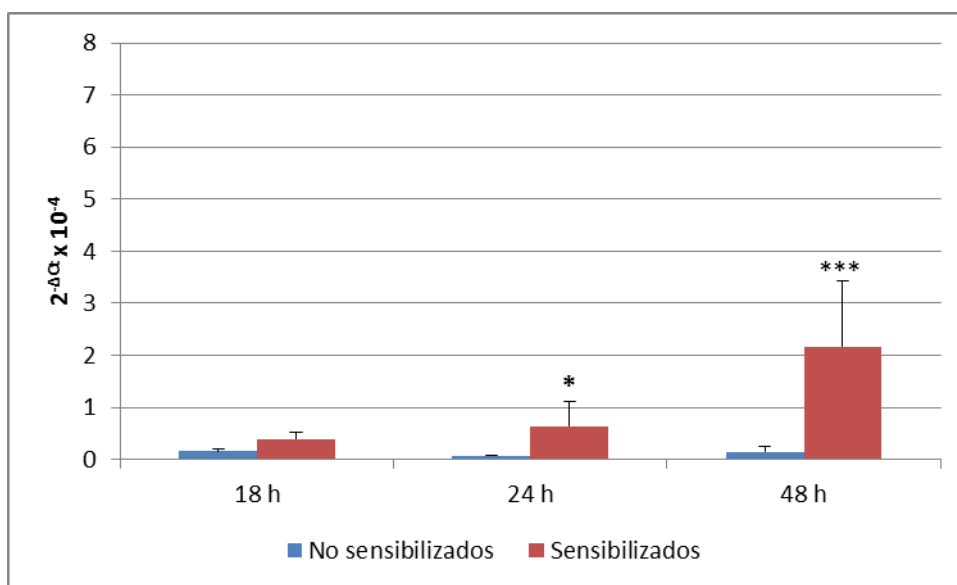


Figura 6.7. Evolución de los niveles de expresión de IL-10 en cultivos de CMSP de ganado vacuno estimulados con antígenos de *H. lineatum* (EE, n=60)

6.3.3. FACTOR DE NECROSIS TUMORAL ALFA (TNF- α)

La media de expresión de TNF- α en cultivos de CMSP de ganado vacuno estimulados con mitógeno y antígenos de *Hypoderma* fue de $1,54 \times 10^{-4}$ (DE= 0,002). Los valores medios en relación a los distintos factores aparecen reflejados en la tabla 6.12. Así, los animales sensibilizados presentaron niveles medios de expresión superiores a los de los no sensibilizados. Del mismo modo estas cifras, se incrementaron en relación al tiempo, se incrementaron a las 24 y 48 horas. Los cultivos estimulados con HyC presentaron mayores valores de expresión para esta misma citoquina que los cultivos no estimulados, mientras que en el caso de la HyB, el ET y la HyA se

detectaron valores más bajos. Por su parte, los cultivos estimulados con mitógeno presentaron niveles más altos de expresión que los no estimulados.

Tabla 6.12. Niveles de expresión de TNF- α en cultivos de CMSP de ganado vacuno estimulados con mitógeno y antígenos de *Hypoderma*

		Media	Error estándar	n= 360
Grupo	No sensibilizados	$3,11 \times 10^{-5}$	$2,072 \times 10^{-5}$	180
	Sensibilizados	$2,78 \times 10^{-4}$	$2,035 \times 10^{-4}$	180
Tiempo	18 h	$3,35 \times 10^{-5}$	$1,118 \times 10^{-5}$	120
	24 h	$3,97 \times 10^{-5}$	$2,540 \times 10^{-5}$	120
	48 h	$3,90 \times 10^{-4}$	$3,055 \times 10^{-4}$	120
Antígeno	CEL	$7,60 \times 10^{-5}$	$4,750 \times 10^{-5}$	72
	ET	$4,35 \times 10^{-5}$	$2,521 \times 10^{-5}$	72
	HyA	$1,47 \times 10^{-5}$	$3,397 \times 10^{-6}$	72
	HyB	$7,39 \times 10^{-5}$	$5,186 \times 10^{-5}$	72
	HyC	$5,64 \times 10^{-4}$	$5,062 \times 10^{-4}$	72
Mitógeno	- PHA	$5,24 \times 10^{-5}$	$2,065 \times 10^{-5}$	180
	+ PHA	$2,57 \times 10^{-4}$	$2,037 \times 10^{-4}$	180

Con respecto al análisis estadístico, de todos los factores analizados, solamente el grupo resultó estadísticamente significativo (Tabla 6.13).

Tabla 6.13. ANOVA multifactorial de los niveles de expresión de TNF- α en cultivos de CMSP de ganado vacuno

	gl	Suma cuadrados	Valor F	P
Grupo	1	40,9	17,3	<0,001***
Residuos	358	845,6		

Los niveles de expresión de TNF- α en cultivos de CMSP aparecen recogidos en la Figura 6.8. Como en los casos anteriores, fueron significativamente superiores en los animales previamente sensibilizados ($p < 0,001$).

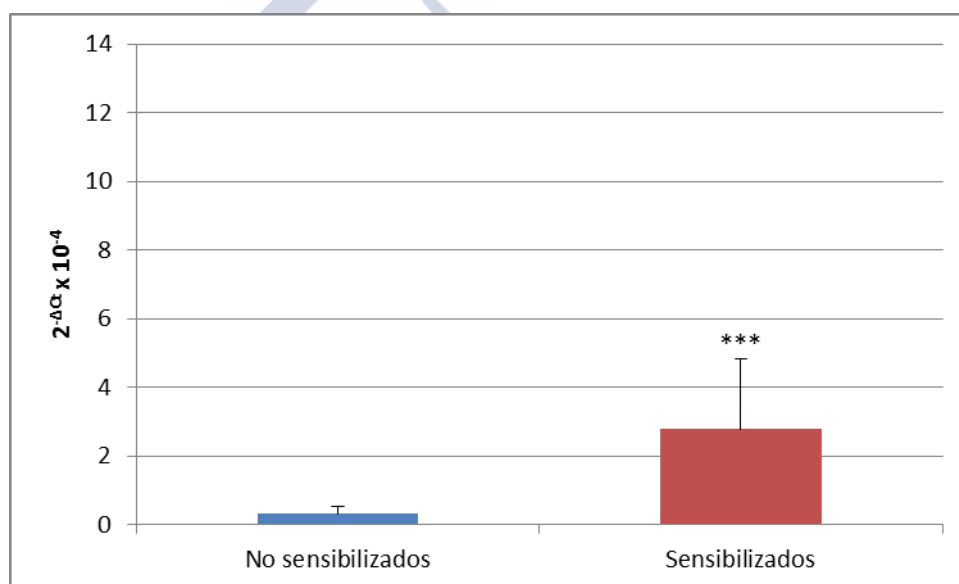


Figura 6.8. Niveles de expresión de TNF- α en cultivos de CMSP de ganado vacuno (EE, n=180)

Así, de acuerdo con otros autores, el TNF- α tendría un papel clave en la respuesta inmunitaria frente al parásito en los animales sensibilizados. En este sentido, Dacal *et al.* (2011) observaron mayores niveles de esta citoquina en la piel de animales reinfestados de forma experimental. Igualmente, Panadero *et al.* (2013), detectaron elevados niveles de TNF- α en sueros de vacas infestadas de forma natural por *Hypoderma*.

En lo que respecta a los distintos antígenos del parásito, mientras que la HyA y el ET indujeron un descenso en la expresión de TNF- α , la HyC produjo un apreciable incremento de la misma (figura 6.9.) Sin embargo, estas variaciones no fueron estadísticamente significativas. Este hallazgo guardaría relación con el efecto inhibitor de antígenos salivales de garrapatas sobre la síntesis de esta citoquina observado por otros autores (Ramachandra y Wikel, 1992; Brake y de León, 2012).

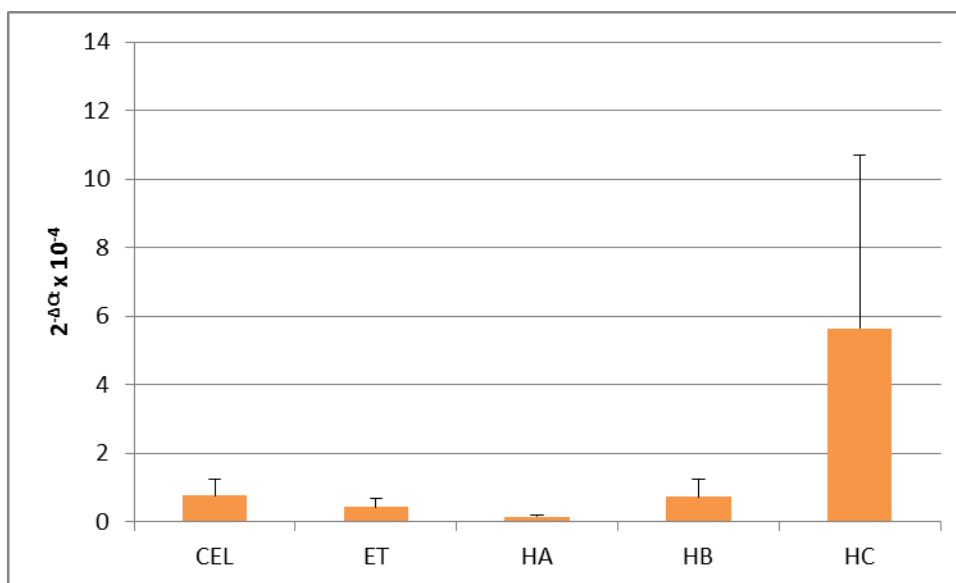


Figura 6.9. Niveles de expresión de TNF- α en cultivos de CMSP de ganado vacuno estimulados con antígenos de *H. lineatum* (EE, n=72)

La evolución en los patrones de expresión de TNF- α se refleja en la Figura 6.10. Así, se observó un incremento acusado en la expresión de esta citoquina a las 48 horas; sin embargo, las diferencias no fueron significativas.

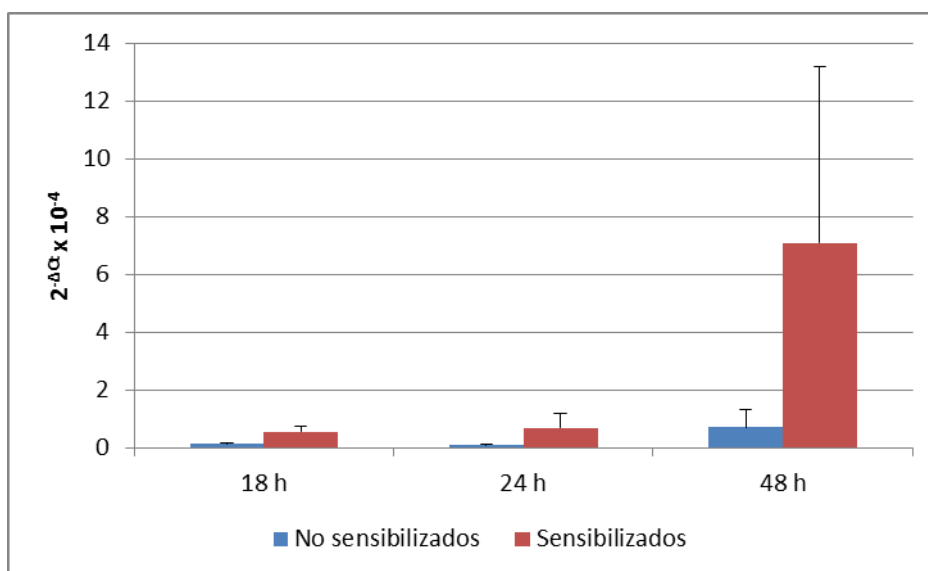


Figura 6.10. Evolución de los niveles de expresión de TNF- α en cultivos de CMSP de ganado vacuno estimulados con antígenos de *H. lineatum* (EE, n=60)

6.3.4. INTERLEUQUINA 4 (IL-4)

El valor medio de expresión de la IL-4 en los cultivos realizados fue $1,48 \times 10^{-4}$ (DE= 0,002). Como puede observarse en la tabla 6.14, los animales sensibilizados presentaron mayores niveles de expresión que los no sensibilizados. Asimismo, la expresión de esta citoquina fue incrementándose desde las 18 hasta las 48 horas. En cuanto a los distintos antígenos, los niveles más altos de expresión correspondieron a los cultivos estimulados con HyC, seguidos de los cultivos no estimulados, y de los que contenían ET, HyB e HyA. Como en los casos anteriores, los valores medios fueron superiores en los cultivos estimulados con mitógeno.

Tabla 6.14. Niveles de expresión de IL-4 en cultivos de CMSP de ganado vacuno estimulados con mitógeno y antígenos de *Hypoderma*

		Media	Error estándar	n= 360
Grupo	No sensibilizados	$6,54 \times 10^{-6}$	$3,731 \times 10^{-6}$	180
	Sensibilizados	$2,90 \times 10^{-4}$	$1,782 \times 10^{-4}$	180
Tiempo	18 h	$2,41 \times 10^{-5}$	$9,392 \times 10^{-6}$	120
	24 h	$4,89 \times 10^{-5}$	$3,987 \times 10^{-5}$	120
	48 h	$3,71 \times 10^{-4}$	$2,644 \times 10^{-4}$	120
Antígeno	CEL	$1,23 \times 10^{-4}$	$1,037 \times 10^{-4}$	72
	ET	$6,96 \times 10^{-5}$	$5,352 \times 10^{-5}$	72
	HyA	$1,20 \times 10^{-5}$	$5,413 \times 10^{-6}$	72
	HyB	$3,25 \times 10^{-5}$	$1,412 \times 10^{-5}$	72
	HyC	$5,03 \times 10^{-4}$	$4,308 \times 10^{-4}$	72
Mitógeno	- PHA	$6,52 \times 10^{-5}$	$3,399 \times 10^{-5}$	180
	+ PHA	$2,31 \times 10^{-4}$	$1,754 \times 10^{-4}$	180

En este caso, el análisis estadístico mostró diferencias significativas en relación al grupo y la interacción grupo/tiempo (Tabla 6.15).

Tabla 6.15. ANOVA multifactorial de los niveles de expresión de IL-4 en cultivos de CMSP de ganado vacuno

	gl	Suma cuadrados	Valor F	P
Grupo	1	170,3	31,253	<0,001***
Tiempo	2	28,2	2,585	0,077
Grupo/Tiempo	2	69,9	6,411	0,002**
Residuos	354			

Como se puede observar en la Figura 6.11, los niveles de expresión de IL-4 en los animales sensibilizados fueron significativamente superiores a los de los no sensibilizados ($p < 0,001$).

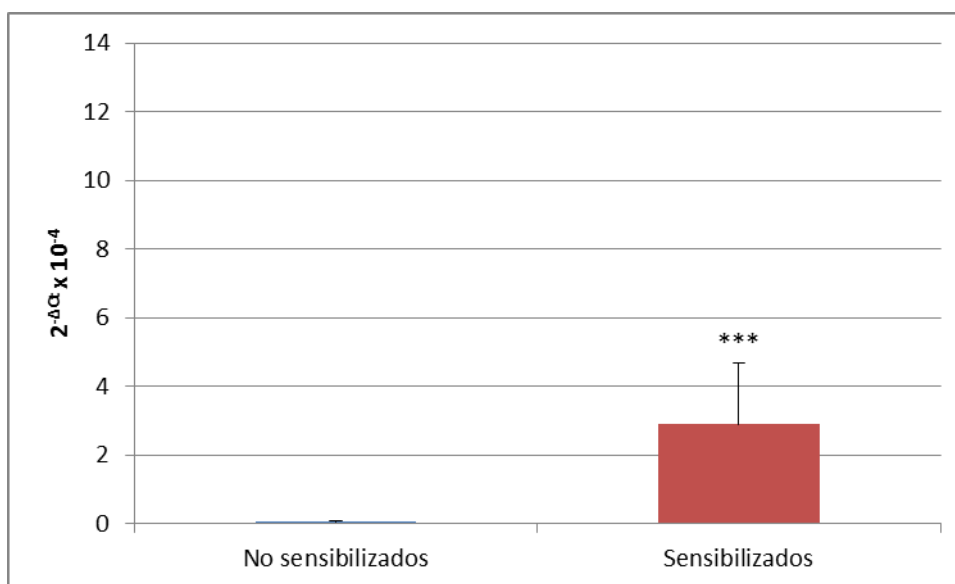


Figura 6.11. Niveles de expresión de IL-4 en cultivos de CMSP de ganado vacuno (EE, n=180)

Estos resultados concuerdan con los de Panadero *et al.* (2009), quienes detectaron mayores niveles de IL-4 en sobrenadantes de cultivos de CMSP de animales sensibilizados frente a *Hypoderma* con respecto a los no sensibilizados. Según estos autores, la elevación de anticuerpos séricos observada entre los 6 y 8 meses postinfestación, se relacionaría con la elevada producción de IL-4 (Panadero *et al.*, 2009). En lo que concierne a las distintas técnicas empleadas en la detección de IL-4 y considerando los datos de este estudio, se observa correspondencia entre los resultados del ELISA y la RT-qPCR.

Con respecto a los antígenos de *Hypoderma*, indujeron un descenso en la expresión de la IL-4, salvo en el caso de la HyC. Sin embargo, estas variaciones no fueron estadísticamente significativas (Figura 6.12.). Estos resultados son similares a los de Panadero *et al.* (2009), quienes detectaron una reducción significativa de los niveles de IL-4 en presencia de ET. Por otro lado, en el capítulo 3 de este estudio, se constató que la adición de IL-4 exógena producía un incremento de los niveles de IL-10 en los sobrenadantes de cultivos estimulados con este antígeno.

Asimismo, Elkington *et al.* (2009) evidenciaron el efecto inhibitorio de antígenos larvarios de *Lucilia cuprina* sobre la expresión de IL-4 en linfocitos de ganado ovino.

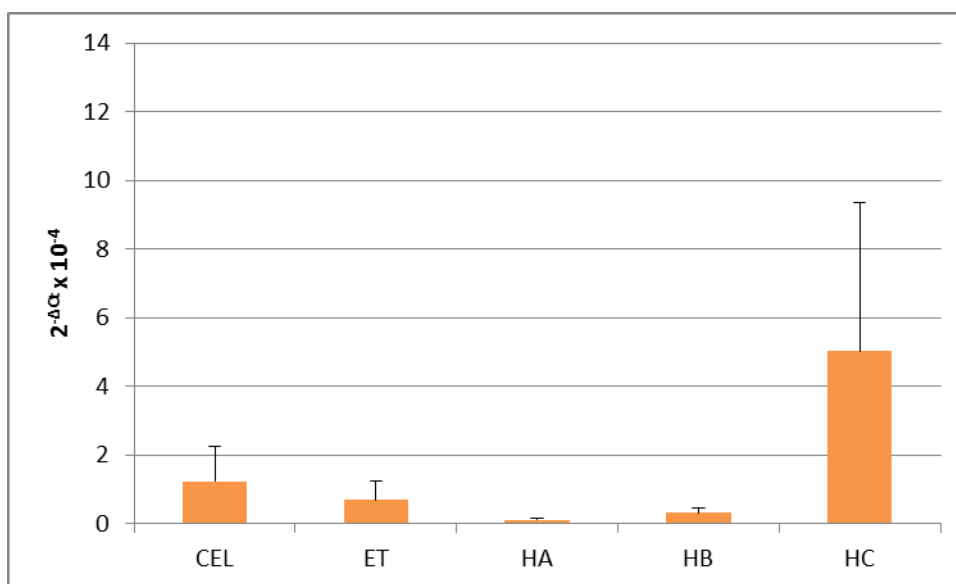


Figura 6.12. Niveles de expresión de IL-4 en cultivos de CMSP de ganado vacuno estimulados con antígenos de *H. lineatum* (EE, n=72)

En relación al patrón de expresión de IL-4, se observaron diferencias significativas entre los distintos tiempos de incubación y grupos de animales (Tabla 6.16). En primer lugar, los animales sensibilizados presentaron valores significativamente mayores que los no sensibilizados para los tres tiempos de incubación. Esto es así, hasta el punto de que los animales sensibilizados a las 18 horas presentaron mayores niveles de IL-4 que los no sensibilizados a las 24 horas. De la misma forma, los animales sensibilizados tuvieron mayores niveles de expresión a las 48 horas con respecto a los no sensibilizados a las 24 horas. Este hecho pondría de manifiesto una mayor respuesta de tipo humoral en los animales sensibilizados frente al parásito, independientemente del tiempo de incubación.

Tabla 6.16. Prueba post-hoc de pares Tukey HSD para la expresión de Il-4. Asociación grupo: tiempo de cultivo

	Diferencia	P
S:1-NS:1	2,57	<0,001***
NS:2-NS:1	0,59	0,739
S:2-NS:1	1,67	0,002*
NS:3-NS:1	1,55	0,004*
S:3-NS:1	2,02	< 0,001***
NS:2-S:1	-1,98	< 0,001***
S:2-S:1	-0,91	0,276
NS:3-S:1	-1,03	0,156
S:3-S:1	-0,55	0,790
S:2-NS:2	1,08	0,119
NS:3-NS:2	0,96	0,220
S:3-NS:2	1,43	0,011*
NS:3-S:2	-0,12	0,999
S:3-S:2	0,36	0,961
S:3-NS:3	0,48	0,873

S (sensibilizados); NS (no sensibilizados); 1 (18h); 2 (24h); 3 (48h)

Por otro lado, la expresión de esta citoquina se incrementó desde las 18 a las 48 horas (Figura 6.13). En el grupo de los animales no sensibilizados, esta variación fue estadísticamente significativa entre las 18 y las 48 horas (Tabla 6.16).

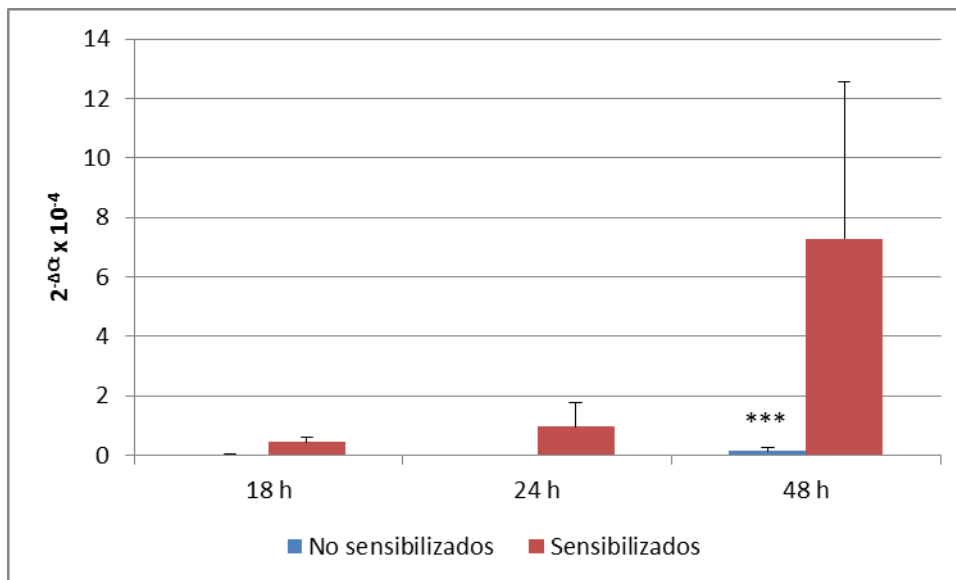


Figura 6.13. Evolución de los niveles de expresión de IL-4 en cultivos de CMSP de ganado vacuno estimulados con antígenos de *H. lineatum* (EE, n=60)

6.3.5. COMPARACIÓN DEL PATRÓN DE EXPRESIÓN DE CITOQUINAS EN ANIMALES SENSIBILIZADOS Y NO SENSIBILIZADOS

Tal y como se aprecia en la figura 6.14, la expresión de las distintas citoquinas fue muy superior en los animales sensibilizados en relación a los no sensibilizados. Este hecho pondría de manifiesto la existencia de una respuesta inmunitaria de base celular de memoria en los animales sensibilizados frente a *Hypoderma*.

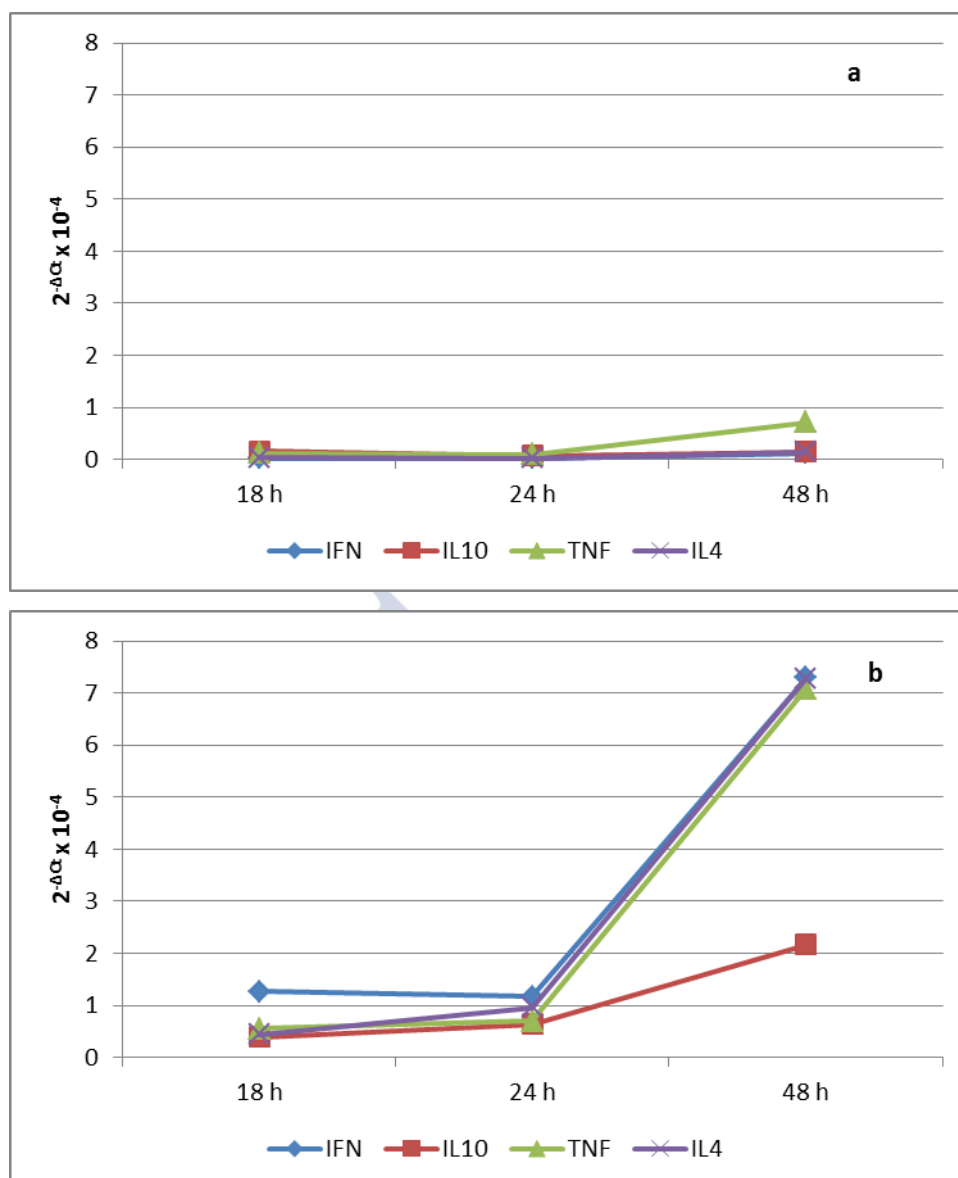


Figura 6.14. Evolución del patrón de expresión de citoquinas en CMSP de animales no sensibilizados (a) y sensibilizados (b) frente a *Hypoderma*

En los animales no sensibilizados, los niveles de expresión de las distintas citoquinas se incrementaron desde las 18 hasta las 48 horas, siendo esta variación más acusada en el caso del TNF- α (Figura 6.14a).

En los animales sensibilizados, en cambio, se detectó un ligero incremento en la expresión de citoquinas a las 24 horas, seguido de un acusado aumento a las 48 horas (Figura 6.14b). Este incremento en la expresión de las distintas citoquinas, fue menos pronunciado en el caso de la IL-10, que fue similar en los dos grupos de animales.

6.3.6. COMPARACIÓN DE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN Y SECRECIÓN DE CITOQUINAS

En este estudio, hemos observado la existencia de correlación entre los niveles de expresión y secreción de las distintas citoquinas estudiadas. Al comparar los resultados del presente capítulo con los de los precedentes, se comprobó que los animales previamente sensibilizados frente a *Hypoderma* presentaron mayores niveles de expresión-secreción de citoquinas que los que no lo estaban. Asimismo, el efecto inmunosupresor de los antígenos parasitarios se constató mediante ambas técnicas. En el caso del IFN- γ , se constató igualmente un paralelismo de la respuesta linfocitaria mediante la técnica del ELISPOT. Estos resultados concuerdan con los de otros autores (Favre *et al.* 1997, Mena *et al.*, 2002) cuando señalan la existencia de correlación entre los resultados de las diversas técnicas de detección de citoquinas, especialmente en el caso del IFN- γ .

Conforme a los resultados obtenidos y su elevada sensibilidad, la RT-qPCR se consideró como la técnica más eficaz para la determinación de citoquinas, siendo posible su detección precoz en cultivos incubados ya a las 18 horas. Asimismo, la adición de mitógeno, que es indispensable en las técnicas inmunológicas, resulta innecesaria en este caso.



7. CONCLUSIONES/ CONCLUSIONS



Los resultados obtenidos en los distintos capítulos de este estudio nos han permitido extraer las siguientes **conclusiones**:

1ª. Durante la fase de localización en el dorso de la hipodermosis, se distinguen tres tipos lesionales en base a la integridad de la cutícula larvaria y las poblaciones inflamatorias presentes. Mientras que las células plasmáticas son las más abundantes cuando la larva se mantiene intacta, los macrófagos y linfocitos son los que predominan en los granulomas formados tras la degradación de la cutícula.

2ª. Las cicatrices que se forman después de la salida o la destrucción de las larvas, se caracterizan por infiltrados perivasculares de células mononucleares y por tejido de granulación formado por fibroblastos y capilares de nueva formación.

3ª. Las células epiteliales que recubren internamente el orificio respiratorio, a diferencia del epitelio normal, reaccionan frente al anticuerpo MAC387, lo que se ha asociado a la expresión de calprotectina, y por tanto esta proteína podría desempeñar un papel fundamental en la respuesta local frente a las larvas de *Hypoderma*.

4ª. La técnica ELISPOT permite obtener buenos resultados sobre la frecuencia de células secretoras de IFN- γ sin necesidad de una reestimulación *in vitro* con antígeno o mitógeno. Por el contrario, cuando se utilizó el ELISA para la detección de IFN- γ en los sobrenadantes de los cultivos celulares se obtuvieron valores muy bajos e incluso por debajo del límite de detección del test. Esto indica que el ELISPOT resulta más sensible y eficaz que el ELISA para detectar la producción de IFN- γ .

5ª. La incubación de las CMSP con los diferentes antígenos de *H. lineatum* en ausencia o presencia de mitógeno, indujo una reducción significativa de la respuesta linfoproliferativa, que siguió siendo patente tras la adición de IFN- γ y la IL-4 exógenos. Estos resultados refuerzan el efecto inmunosupresor que los antígenos de *Hypoderma* ejercen en condiciones *in vitro*.

6ª. La adición del IFN- γ tuvo un efecto inhibitor sobre la respuesta linfoproliferativa en los cultivos coincubados con HyB e HyC, con diferencias significativas entre el índice de estimulación de los cultivos incubados con HyB y los que contenían extracto total.

CONCLUSIONES/CONCLUSIONS

7ª. La adición de IFN- γ e IL-4 exógenos no modificó de forma significativa el efecto inmunosupresor de los antígenos de *Hypoderma* en cultivos celulares de ganado vacuno, ni produjo variaciones ostensibles en los niveles de IL-10.

8ª. La expresión de las citoquinas (IFN- γ , IL-10, IL-4, TNF- α) fue más intensa en CMSP de animales sensibilizados frente a *Hypoderma* que en los no sensibilizados, lo que pondría de manifiesto una respuesta inmunitaria de memoria frente al parásito. Además, los niveles de expresión aumentaron con el tiempo de incubación, obteniéndose valores máximos a las 48 horas.

9ª. La adición de los distintos antígenos de *Hypoderma* a los cultivos de CMSP de ganado vacuno produjo un descenso generalizado de la expresión y secreción de las citoquinas estudiadas, evidenciando así el papel inmunosupresor de las secreciones larvarias.

10ª. El efecto inmunosupresor del extracto total, constituido por las 3 hipoderminas larvarias, especialmente en cultivos no sensibilizados, explicaría la inhibición o atenuación de la respuesta celular frente al parásito en ganado vacuno primoinfectado y sugiere su intervención en la aparición del mayor número de nódulos larvarios que, por regla general, se observa en los animales más jóvenes.

In view of the results from different chapters, we have drawn the following **conclusions**:

1st. During the back stage of hipodermosis, three types of lesions were described according to the integrity of the cuticle and inflammatory cell populations. While plasmatic cells were the most abundant when larvae were intact, macrophages and lymphocytes predominated in granulomas formed after cuticle degradation.

2nd. Perivascular infiltrates mainly composed by mononuclear cells and granulation tissue containing fibroblasts and new vessels were observed in the scars formed after larvae outcome or destruction.

3rd. Epithelial cells recovering the breathing hole, unlike remaining epithelium, reacted against MAC 387 antibody. This fact has been associated to calprotectin expression, a protein that may play an essential role in the local response against *Hypoderma* larvae.

4th. The ELISPOT technique allows determining the frequency of IFN- γ secreting cells in absence of *in vitro* re-stimulation with antigen or mitogen. On the contrary, IFN- γ detection in culture supernatants through ELISA had very low values or below the detection limit. This fact indicates that ELISPOT is more sensitive than ELISA to detect IFN- γ production.

5th. The addition of *H. lineatum* antigens in absence or presence of the mitogen produced a significant reduction in the lymphoproliferative response in PBMCs cultures. This reduction was evident even after the addition of IFN- γ and IL-4. This finding highlights the *in vitro* immunosuppressive effect of *Hypoderma* antigens.

6th. Exogenous IFN- γ addition produced an inhibitory effect on lymphoproliferative response in cultures co-incubated with HyB and HyC, significant differences between the stimulation index of HyB and CLE co-incubated cultures were observed.

7th. Exogenous IFN- γ and IL-4 addition did not modify the immunosuppressive effect of *Hypoderma* antigens in PBMCs cultures or IL-10 levels.

8th. Cytokine expression (IFN- γ , IL-10, IL-4, TNF- α) was higher in previously sensitized PBMCs than in no sensitized ones. This finding may suggest a memory

CONCLUSIONES/CONCLUSIONS

immune response against *Hypoderma*. Thus, cytokine expression increased over time until 48 hours. At this timing point, the highest values were observed.

9th. The addition of *Hypoderma* antigens to cattle PBMCs decreased the expression, secretion and production of cytokines, highlighting their immunosuppressive effect.

10th. The immunosuppressive effect of CLE, composed by the three hipodermin, especially in no sensitized cultures may explain the inhibition or attenuation of cellular response against the parasite in primoinfested cattle. This fact may be responsible of higher number of warbles in young animals.





8. RESUMEN/RESUMO/SUMMARY



Las larvas de *Hypoderma* spp son parásitos obligados que migran y se alimentan durante varios meses en diversos tejidos del hospedador. Actualmente falta información acerca de los mecanismos inmunitarios que inducen inmunidad protectora frente a *Hypoderma* en ganado vacuno, en particular sobre lo que ocurre en la fase subcutánea del dorso. Por otro lado, conocida la relevancia de las citoquinas como moduladores de la respuesta del hospedador, resulta fundamental estudiar el efecto de los distintos antígenos del parásito sobre su producción, para lo que son útiles técnicas inmunoenzimáticas y de biología molecular que, si bien se emplean habitualmente en humanos o animales de experimentación, en cambio, su aplicación en animales de renta y, sobre todo, en ganado vacuno es más bien reducida.

En el **capítulo 1** de este trabajo nos propusimos estudiar la respuesta celular así como la producción de IFN- γ en el tejido subcutáneo del dorso; para ello se analizaron, mediante histología e inmunohistoquímica, muestras de piel de tres vacas infestadas de forma natural por el parásito.

Durante la etapa dorsal de la hipodermosis, se distinguen tres tipos de lesiones en base a la integridad de la cutícula larvaria y las poblaciones inflamatorias presentes. En las lesiones tipo 1 existe un predominio de la respuesta humoral, de modo que histológicamente, se caracterizan por una larva con la cutícula intacta y rodeada de un infiltrado celular compuesto fundamentalmente por células plasmáticas. En las lesiones tipo 2, en las que la cutícula de las larvas se encontraba degradada, el infiltrado inflamatorio estaba compuesto principalmente de células epitelioides, células gigantes multinucleadas, células de cuerpo extraño y de tipo Langhans, formando un granuloma bien definido, rodeado por una capa de linfocitos y más externamente, una cápsula de tejido conectivo. En las lesiones tipo 3, en las cicatrices resultantes tras la salida de las larvas o su destrucción total, las lesiones observadas fueron infiltrados mononucleares perivasculares y tejido de granulación compuesto por fibroblastos y neovasos. En relación a las poblaciones celulares halladas mediante inmunohistoquímica, en las lesiones tipo 1 se observaron abundantes linfocitos CD79+ y células IgG+, además de macrófagos activados marcados frente a lisozima y CD68 y MAC387+, como macrófagos recién reclutados. Igualmente, el epitelio que cubría el orificio del nódulo fue positivo a este anticuerpo, resultando negativo el resto del epitelio. Este hecho se relacionó con la intensa expresión de calprotectina, proteína que el anticuerpo MAC387 reconoce, en la que intervienen las células epiteliales “reactivas” y que podría jugar un papel fundamental en la respuesta local frente a las larvas de *Hypoderma*. En las

lesiones tipo 2, predominaron los linfocitos CD3⁺ en forma de agregados y los macrófagos marcados con lisozima y CD68. En las lesiones tipo 3, se encontraron linfocitos CD3⁺ dispersos. En lo que concierne a la producción de IFN- γ , no se observaron diferencias significativas entre los distintos tipos lesionales.

En el **capítulo 2** nos planteamos la puesta a punto y empleo de una técnica de enzimoimmunoanálisis de recuento de puntos (ELISPOT) para la detección de células secretoras de IFN- γ en cultivos de células mononucleares de sangre periférica (CMSP) de ganado vacuno. Para ello, se tomaron muestras de sangre de 4 vacas con infestación natural por *Hypoderma* sp. y 4 terneros sin contacto previo con el parásito. Una vez aisladas las CMSP se incubaron con distintos antígenos de *H. lineatum* (hipoderminas A, B, C y extracto total larvario) y con el mitógeno fitohemaglutinina A (PHA). Paralelamente, se realizaron cultivos en las mismas condiciones, para la determinación de las concentraciones de IFN- γ en los sobrenadantes mediante ELISA sándwich.

En lo que respecta al ELISPOT, la incubación de los linfocitos con mitógeno se tradujo en un incremento en el número de células productoras de IFN- γ tanto en animales no sensibilizados como sensibilizados. Si bien la producción espontánea de IFN- γ fue mayor en los animales no sensibilizados, el efecto del mitógeno fue más acusado en los previamente sensibilizados. Por otro lado, la adición de los distintos antígenos produjo un descenso en el número de células secretoras de IFN- γ en ambos grupos, observándose una gran variabilidad en la respuesta de los animales. Mientras que la HyB fue la responsable del mayor efecto inmunosupresor en animales no sensibilizados, en los animales previamente sensibilizados, este resultado se produjo con la incubación con ET. En relación al ELISA, los resultados fueron similares, si bien en ausencia de mitógeno los valores eran muy bajos o se encontraban por debajo del límite de detección (1 ng/ml). Esto indicaría que el ELISPOT resulta más sensible que el ELISA para detectar la producción de IFN- γ , debido a que la citoquina secretada por las células es capturada directamente en la fase sólida antes de que se diluya en el sobrenadante y sea degradada por proteasas o capturada por células adyacentes.

En el **capítulo 3**, con el objetivo de determinar “*in vitro*” el efecto regulador del IFN- γ y la IL-4 en la respuesta proliferativa frente a los antígenos de *H. lineatum* y en la secreción de IL-10, se realizaron cultivos de CMSP de terneros no sensibilizados frente a *Hypoderma* spp.

La incubación de las CMSP con los diferentes antígenos de *H. lineatum* en ausencia o presencia del mitógeno concanavalina A (ConA), indujo una reducción

significativa de la respuesta linfoproliferativa. Esta reducción siguió siendo significativa tras la adición del IFN- γ y la IL-4. La adición del IFN- γ tuvo un efecto inhibitor sobre la respuesta linfoproliferativa en los cultivos incubados con HyB e HyC, con diferencias significativas entre el índice de estimulación de los cultivos incubados con HyB y ET. La adición de IL-4 exógena a los cultivos no modificó de forma significativa el índice de estimulación del mitógeno ConA, independientemente del antígeno. Finalmente, la suplementación exógena con IFN- γ e IL-4 no produjo grandes diferencias en los niveles de IL-10, salvo en los sobrenadantes de los cultivos estimulados con HyB, los cuales presentaron niveles más elevados de esta citoquina tras la adición de IL-4.

En el **capítulo 4** se puso a punto un protocolo de RT-qPCR para la detección y cuantificación de la expresión de las citoquinas IFN- γ , IL-10, IL-4 y TNF- α en cultivos de CMSP de seis terneros no sensibilizados y seis vacas con infestaciones anteriores, estimulados con los distintos antígenos parasitarios.

Los niveles de expresión de las distintas citoquinas fueron significativamente superiores en los animales sensibilizados en relación a los que no lo estaban, salvo en el caso de la IL-10. En cuanto al efecto de los distintos antígenos de *Hypoderma* sobre la expresión de las citoquinas, el ET produjo una reducción significativa de la expresión del IFN- γ , mientras que la HyB ejerció el mismo efecto inmunosupresor sobre la expresión de la IL-10. En lo que concierne a los tiempos de incubación, se observaron diferencias en el patrón de expresión de las cuatro citoquinas. En general, los niveles de expresión de las citoquinas aumentaron desde las 18 hasta las 48 horas, exceptuando el TNF- α , para el que no se observaron diferencias significativas en relación al tiempo.

Al comparar los resultados de la RT-qPCR con los del ELISA y ELISPOT, se observó que había una correspondencia entre ellas en lo que se refiere a la expresión y secreción de las citoquinas estudiadas. En el presente estudio, hemos comprobado que los animales previamente sensibilizados frente al parásito presentan mayores niveles de expresión-secreción de citoquinas que los que no habían tenido contacto con el parásito. Asimismo, el efecto inmunosupresor de los antígenos de *Hypoderma* se puso de manifiesto con las tres técnicas, presentando la RT-qPCR un límite de detección más bajo.

Palabras clave: *Hypoderma*, ganado vacuno, citoquinas, ELISA, ELISPOT, RT-qPCR.

RESUMO

As larvas de *Hypoderma* spp son parasitos obrigados que migran e aliméntanse durante varios meses en diversos tecidos do hospedeiro. Actualmente, falta información sobre os mecanismos inmunitarios responsables que inducen inmunidade protectora fronte a *Hypoderma* en gando vacún, en particular sobre o que acontece na fase subcutánea do dorso. Por outro lado e dada a relevancia das citocinas como moduladores da resposta do hospedeiro, resulta fundamental estudar o efecto dos distintos antíxenos do parasito sobre a súa produción, para o que son útiles técnicas inmunoenzimáticas e de bioloxía molecular que, se ben se empregan habitualmente en humanos ou animais de experimentación, en cambio, a súa aplicación en animais de renda e, sobre todo, no gando vacún é mais ben reducida.

No **capítulo 1** deste traballo propuxémonos estudar a resposta celular así como a produción de IFN- γ no tecido subcutáneo do dorso, para elo analizáronse, mediante histoloxía e inmunohistoquímica, mostras de pel de tres vacas infestadas de forma natural polo parasito.

Durante a etapa dorsal da hipodermose, distínguense tres tipos de lesións en base á integridade da cutícula larval e as poboacións inflamatorias presentes. Nas lesións tipo 1 existe un predominio da resposta humoral, de modo que histoloxicamente caracterizáronse por unha larva coa cutícula intacta e rodeada dun infiltrado celular composto fundamentalmente por células plasmáticas. Nas lesións tipo 2, nas que a cutícula das larvas se encontraba degradada, o infiltrado inflamatorio estaba composto principalmente de células epitelioides, células xigantes multinucleadas, células de corpo extraño e de tipo Langhans, formando un granuloma ben definido, rodeado por unha capa de linfocitos e mais externamente unha cápsula de tecido conectivo. Nas lesións tipo 3, nas cicatrices resultantes trala saída das larvas ou a súa destrución total, as lesións observadas foron infiltrados mononucleares perivasculares e tecido de granulación composto por fibroblastos e neovasos. En relación ás poboacións celulares achadas mediante inmunohistoquímica, nas lesións tipo 1 observáronse abundantes linfocitos CD79+ e células IgG+, ademais de macrófagos activados marcados fronte a lisozima e CD68 e MAC387+, como macrófagos recen recrutados. Igualmente, o epitelio que cubría o orificio do nódulo foi positivo a este anticorpo, resultando negativo o resto do epitelio. Este feito relacionouse coa intensa expresión de calprotectina, proteína recoñecida polo anticorpo MAC387, na que interveñen células epiteliais

“reactivas” e que podería xogar un papel fundamental na resposta local fronte ás larvas de *Hypoderma*. Nas lesións tipo 2, predominaron os linfocitos CD3+ en forma de agregados e os macrófagos marcados con lisozima e CD68. Nas lesións tipo 3, encontráronse linfocitos CD3+ dispersos. No que atinxe á produción de IFN- γ , non se observaron diferenzas significativas entre os distintos tipos lesionais.

No **capítulo 2**, propuxémonos a posta a punto e emprego dunha técnica de enzimoimmunoanálisis de reconto de puntos (ELISPOT) para a detección de células secretoras de IFN- γ en cultivos de células mononucleares de sangue periférico (CMSP) de gando vacún. Para elo, tomáronse mostras de sangue de 4 vacas con infestación natural por *Hypoderma* sp. e 4 tenreiros sen contacto previo co parasito. Unha vez illadas as CMSP incubáronse con distintos antíxenos de *H. lineatum* (hipoderminas A, B, C e extracto total larvario) e co mitóxeno fitohemaglutinina A (PHA). Paralelamente, realizáronse cultivos nas mesmas condicións, para a determinación das concentracións de IFN- γ nos sobrenadantes mediante ELISA sándwich.

No que respecta ao ELISPOT, a incubación dos linfocitos con mitóxeno traducíuse nun incremento do número de células produtoras de IFN- γ tanto en animais non sensibilizados coma non sensibilizados. Se ben a produción espontánea de IFN- γ foi maior nos animais non sensibilizados, o efecto do mitóxeno foi mais acusado nos previamente sensibilizados. Por outro lado, a adición dos distintos antíxenos produciu un descenso no número de células secretoras de IFN- γ en ambos grupos, observándose unha gran variabilidade na resposta dos animais. Mentres que a HyB foi a responsable do maior efecto inmunosupresor en animais non sensibilizados, nos animais previamente sensibilizados, este resultado produciuse coa incubación con ET. En relación ao ELISA, os resultados foron similares, se ben en ausencia de mitóxeno os valores eran moi baixos ou atopábanse por debaixo do límite de detección (1 ng/ml). Isto indicaría que o ELISPOT resulta mais sensible que o ELISA para detectar a produción de IFN- γ , debido a que a citocina secretada polas células é capturada directamente na fase sólida antes de que se dilúa no sobrenadante e sexa degradada por proteasas ou capturada por células adxacentes.

No **capítulo 3**, co obxectivo de determinar “*in vitro*” o efecto regulador do IFN- γ e a IL-4 na resposta proliferativa fronte aos antíxenos de *H. lineatum* e na secreción de IL-10, realizáronse cultivos de CMSP de tenreiros non sensibilizados fronte a *Hypoderma* spp.

A incubación das CMSP cos diferentes antígenos de *H. lineatum* en ausencia ou presenza do mitóxeno concanavalina A (ConA), induciu unha redución significativa da resposta linfoproliferativa. Esta redución seguiu sendo significativa trala adición do IFN- γ e a IL-4. A adición do IFN- γ tivo un efecto inhibitor sobre a resposta linfoproliferativa nos cultivos incubados con HyB e HyC, con diferenzas significativas entre o índice de estimulación dos cultivos incubados con HyB e ET. A adición de IL-4 esóxena aos cultivos non modificou de forma significativa o índice de estimulación do mitóxeno ConA, independentemente do antígeno. Finalmente, a suplementación esóxena con IFN- γ e IL-4 non produciu grandes diferenzas nos niveis de IL-10, salvo nos sobrenadantes dos cultivos estimulados con HyB, os cales presentaron niveis máis elevados desta citocina trala adición de IL-4.

No **capítulo 4** púxose a punto un protocolo de RT-qPCR para a detección e cuantificación da expresión das citocinas IFN- γ , IL-10, IL-4 y TNF- α en cultivos de CMSP de seis tenreiros non sensibilizados e seis vacas con infestacións anteriores, estimulados cos distintos antígenos parasitarios.

Os niveis de expresión das distintas citocinas foron significativamente superiores nos animais sensibilizados en relación aos que non o estaban, salvo no caso da IL-10. En cuanto ao efecto dos distintos antígenos de *Hypoderma* sobre a expresión das citocinas, o ET produciu unha redución significativa da expresión de IFN- γ , mentres que a HyB exerceu o mesmo efecto inmunosupresor sobre a expresión da IL-10. No tocante aos tempos de incubación, observáronse diferenzas significativas no patrón de expresión das catro citocinas. En xeral, os niveis de expresión das citocinas aumentaron desde as 18 ata as 48 horas, exceptuando o TNF- α , para o que non se observaron diferenzas significativas en relación ao tempo.

Ao comparar os resultados da RT-qPCR cos do ELISA e ELISPOT, observouse que había unha correspondencia entre elas no que se refire á expresión e secreción das citocinas estudadas. No presente estudio, comprobamos que os animais previamente sensibilizados fronte ao parasito presentan maiores niveis de expresión-secreción de citocinas que os non tiveran contacto co parasito. Así mesmo, o efecto inmunosupresor dos antígenos de *Hypoderma* púxose de manifesto coas tres técnicas, presentando a RT-qPCR un límite de detección máis baixo.

Palabras Chave: *Hypoderma*, gando vacún, citocinas, ELISA, ELISPOT, RT-qPCR.

SUMMARY

Hypoderma larvae are obligate parasites that migrate and feed from several host tissues during months. Currently, not much information about immunity against *Hypoderma* in cattle is available, especially concerning to the subcutaneous back phase. Considering the cytokines main role as modulators of the host immune response, it is worthy to study the effect of the different antigens of the parasite on their production. Thus, immunoenzymatic and molecular biology techniques are useful for this purpose. Although these techniques are very common in human and mice, its application in livestock, especially in cattle, is more reduced.

In **chapter 1**, we studied cellular response and IFN- γ production in the subcutaneous tissue of the back. Skin samples from three naturally infested cattle were analysed using histology and immunohistochemistry.

During the back phase of hipodermosis, three types of lesions were described according to the integrity of the cuticle and cell populations. In type 1 lesions, a predominance of humoral response was detected. Thus, larvae with the intact cuticle and surrounded by a cellular infiltrate mainly composed by plasma cells were observed. In type 2 lesions, cuticle was degraded and inflammatory infiltrate was mainly composed by epithelioid cells, giant cells, foreign body cells and Langhans cells, forming a well-defined granuloma, surrounded by a lymphocyte layer and connective tissue externally. In type 3 lesions, scars formed after larvae outcome or destruction, mononuclear perivascular infiltrates and granulation tissue with fibroblasts and new vessels were observed. Regarding immunohistochemistry results, CD79+ lymphocytes and IgG+ cells, as well as activated macrophages immune-labelled with lysozyme and CD68 and recently recruited ones, positive to MAC 387, were detected in type 1 lesions. The epithelium covering the opening of the warble was also positive to this antibody. This fact could be related to calprotectin production, a protein that MAC387 recognised, by reactive epithelial cells. This molecule may play an important role in local response against *Hypoderma* larvae. In type 2 lesions, CD3+ lymphocytes forming aggregates and macrophages immunolabeled with lysozyme and CD68 were the most abundant cells. In type 3 lesions, scattered CD3+ were the only cell population. Regarding IFN- γ production, there were no significant differences between different lesions.

In **chapter 2**, we assessed and employed an ELISPOT test to detect IFN- γ secreting cells in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from cattle. Blood samples from four infested cattle and four naïve calves were taken in this study. After isolation, PBMCs were incubated with *Hypoderma* antigens (hipodermin A, B, C and crude larval extract-CLE-) and the mitogen phytohemagglutinin A (PHA). Parallel cultures were also performed to determine IFN- γ levels in supernatants through sandwich ELISA.

Regarding ELISPOT, PBMCs incubation with mitogen produced an increase in the number of IFN- γ secreting cells in both sensitized and no sensitized animals. While spontaneous IFN- γ production was higher in no sensitized animals, the effect of the mitogen was more evident in previously sensitized ones. The addition of different antigens produced a decrease in the number of IFN- γ secreting cells and high variability was observed between animals. While HyB was responsible for the major immunosuppressive effect in no sensitized animals, CLE produced the strongest decrease in previously sensitized ones. ELISA results were very similar to ELISPOT ones but IFN- γ levels were very low or even below the limit of detection (1 ng/ml) in this case. This fact may suggest that ELISPOT is more sensitive than ELISA to detect IFN- γ production. Thus, cytokine is captured directly in the solid phase before diluting in the supernatant and degrading by proteases or captured by adjacent cells.

In **chapter 3**, PBMCs cultures from naïve calves against *Hypoderma* were performed to determine the regulatory effect of IFN- γ and IL-4 in the proliferative response against *H. lineatum* antigens and their effect on IL-10 secretion.

PBMCs incubation with *H. lineatum* antigens in absence or presence of the mitogen concanavalin A (ConA) produced a significant reduction in lymphoproliferative response. This reduction was significant even after the addition of exogenous IFN- γ and IL-4. The addition of IFN- γ had an inhibitory effect on lymphoproliferative response in cultures incubated with HyB and HyC, with significant differences between stimulation index of cultures incubated with HyB and CLE. The addition of exogenous IL-4 did not modify the stimulation index of ConA, independently of the antigen. Finally, exogenous supplementation with IFN- γ and IL-4 did not produce big variations in IL-10 levels, except in supernatants from cultures stimulated with HyB, which had higher levels of this cytokine after IL-4 addition.

In **chapter 4**, we assessed a RT-qPCR protocol to detect and quantify IFN- γ , IL-10, IL-4 and TNF- α expression in PBMCs cultures from six naïve calves and six cattle previously infested with *Hypoderma* stimulated with parasitic antigens.

In general, expression levels of cytokines were significantly higher in previously sensitized animals, except IL-10. Regarding the effect of the different antigens, CLE produced a significant reduction of IFN- γ expression and HyB had the major immunosuppressive effect in IL-10 expression. Regarding the different timing points, differences in the dynamic of expression between four cytokines were observed. While IFN- γ , IL-10 and IL-4 expression increased from 18 to 48 hours, no significant differences in TNF- α expression were detected.

Comparing results from RT-qPCR, ELISA and ELISPOT, a correspondence between techniques was observed regarding cytokine expression and secretion. In this study, we concluded that previously sensitized animals have higher levels of cytokines expression-secretion than naïve animals. Moreover, the immunosuppressive effect of *Hypoderma* antigens was revealed through the three techniques, having RT-qPCR the lowest detection limit.

Key words: *Hypoderma*, cattle, cytokines, ELISA, ELISPOT, RT-qPCR.





9. BIBLIOGRAFÍA



- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; POBER, S. J. (2002). *Inmunología celular y molecular*. 4ª edición. Ed Mc Graw-Hill, Interamericana.
- ABUL-HAK, J. (1973). Seasonal occurrence of *Hypoderma* spp. (Diptera: Oestridae) warble flies on cattle in Baghdad area, Iraq. *Bulletin of Endemic Diseases*, **14**: 73-81.
- ACKERMANN, M.R.; DEBEY, B.M.; STABEL, T.J.; GOLD, J.H.; REGISTER, K.B.; MEEHAN, J. T. (1994). Distribution of anti-CD68 (EBM11) immunoreactivity in formalin-fixed paraffin-embedded bovine tissues. *Veterinary Pathology*, **31**: 340-348.
- AGOSTINI, C.; SEMENZATO, G. (2003). Biology and immunology of the granuloma. In: DG James, A Zumlaed. *The Granulomatous Disorders*. Cambridge UK: Cambridge University Press, 1999, pp. 3-16.
- AL-BADER, M.D.; AL-SARRAF, H.A. (2005). Housekeeping gene expression during fetal brain development in the rat-validation by semi-quantitative RT-PCR. *Developmental Brain Research*, **156**: 38-45.
- ALVES, M.; GUZYLACK-PIRIOU, L.; JUILLARD, V.; AUDONNET, J.C.; DOEL, T.; DAWSON, H.; GOLDE, W.T.; GERBER, H.; PEDUTO, N.; MCCULLOUGH, K.C.; SUMMERFIELD, A. (2009). Innate immune defenses induced by CpG do not promote vaccine-induced protection against foot-and-mouth disease virus in pigs. *Clinical and Vaccine Immunology*, **16**: 1151-1157.
- ARAUJO-CHAVIRON, N. (1994). *Etude d'Hypoderma lineatum (de Villiers 1789): aspects épidémiologiques et interaction hôte-parasite*. Tesis doctoral. Universidad de Berna.
- ARRU, E.; LEONI, A.; GARIPPA, G.; RASSU, A. (1985). Ipodermosi bovina. Localizzazioni stagionali delle larve e lesioni anatomico-patologiche. *Atti della Società Italiana di Buiatria*, **17**: 697-707.

- AVERILL, M.M.; KERKHOFF, C.; BORNFELDT, K.E. (2012). S100A8 and S100A9 in cardiovascular biology and disease. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, **32**: 223-229.
- AZIZ, N.; NISHANIAN, P.; MITSUYASU, R.; DETELS, R.; FAHEY, J.L. (1999). Variables that affect assays for plasma cytokines and soluble activation markers. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, **6**: 89-95.
- BARON, R.W. (1987). Inhibition of the bovine response by warble grub infestations. *Research Highlights*, **88**: 42-44.
- BARON, R.W. (1990). Cleavage of purified bovine complement component C₃ in larval *Hypoderma lineatum* (Diptera: Oestridae) hypodermis. *Journal of Medical Entomology*, **27**: 899-904.
- BARON, R.W.; COLWELL, D.D. (1991). Mammalian immune responses to miasis. *Parasitology Today*, **7**: 353-355.
- BARON, R.W.; WEINTRAUB, J. (1986). Immunization of cattle against hypodermatosis *Hypoderma lineatum* (De Vill.) and *H. bovis* (L.) using *H. lineatum* antigens. *Veterinary Parasitology*, **21**: 43-50.
- BARON, R.W.; WEINTRAUB, J. (1987). Lymphocyte responsiveness in cattle previously infested and uninfested with *Hypoderma lineatum* (De Vill.) and *Hypoderma bovis* (L.) (Diptera: Oestridae). *Veterinary Parasitology*, **21**: 43-50.
- BARQUET, P.; CHABAUDIE, N.; NICOLAS, I.; BOULARD, C. (1992). Action des hypodermes sur la migration et l'expression des neutrophiles bovins. Journées d'animation scientifique, INRA, Maisons-Alfort, octobre 1992.
- BARRAL, B. (2000). *Estudio del perfil de las IgM e IgG totales y las subclases IgG1 e IgG2 en la hipodermosis bovina*. Memoria de Licenciatura. Facultad de Veterinaria. Universidad de Santiago de Compostela.
- BATTAGLIA, M.; PEDRAZZOLI, P.; PALERMO, B.; LANZA, A.; BERTOLINI, F.; GIBELLI, N.; DA PRADA, G.A.; ZAMBELLI, A.; PEROTTI, C.; DELLA CUNA, G.R. (1998). Epithelial tumour cell detection and the unsolved

- problems of nested RT-PCR: A new sensitive one step method without false positive results. *Bone Marrow Transplantation*, **22**: 693-698.
- BEESLEY, W.N. (1962). Observations on the development of *Hypoderma bovis* De Geer (Diptera, Oestridae) in the bovine host. *Research in Veterinary Science*, **3**: 203-208.
- BEESLEY, W.N. (1966). Further observations on the development of *Hypoderma lineatum*, Villiers and *Hypoderma bovis*, de Geer (Diptera: Oestridae) in the bovine host. *British Veterinary Journal*, **122**: 91-98.
- BEESLEY, W.N. (1974). Datos económicos y progresos en la erradicación de la hipodermosis bovina en Gran Bretaña. *Noticias Médico-Veterinarias*, **4**: 342-355.
- BENAKHLA, A.; BOULARD, C.; SEDRAQUI, S.; OUSSAID, F. (1993). L'hypodermose bovine: approche épidémiologique et caractérisation du cycle biologique en vue de l'établissement d'un plan de profilaxie dans le nord est Algérien. *Revue de Médecine Vétérinaire*, **144**: 693-700.
- BERKENKAMP, S.D.; DRUMMOND, R.O. (1990). Hypodermosis-part I + part II. *Compendium on continuing education for the practicing veterinarian*, **12**: 740-746 + 881-888.
- BIENVENU, J.A.D. MONNERET, G.; GUTOWSKI, M.C.; FABIEN, N. (1998). Cytokine assays in human sera and tissues. *Toxicology*, **129**: 55-61.
- BOEHM, U.; KLAMP, T.; GROOT, M.; HOWARD, J.C. (1997). Cellular responses to interferon-gamma. *Annual Review of Immunology*, **15**: 749-795.
- BORCHERT, A. (1964). Parasitología Veterinaria. Ed. Acribia, Zaragoza: 548-571.
- BOULARD, C. (1969). Anatomie et histologie du tube digestif de la larve d'*Hypoderma bovis* (Diptères, Oestriiformes). *Annales de la Société Entomologique Française New Séries*, **5**: 371-387.
- BOULARD, C. (1970). Etude préliminaire d'une collagénase brute extraite de la larve de premier stade d'*Hypoderma lineatum* (De Villers). *Rendu de l'Académie des Compte Sciences*, Paris, **270**: 1349-1351.

- BOULARD, C. (1975). Evolution des anticorps circulants chez les bovins traités contre l'hypodermose. *Annales de Recherche Vétérinaire*, **6**: 143-154.
- BOULARD, C. (1979). Circulating antibodies and blood histamine in cattle after treatment against hypodermosis. *Veterinary Parasitology*, **5**: 379-387.
- BOULARD, C. (1985). Avantages de l'immunodiagnostic de l'hypodermose bovine établi par hemagglutination passive et par ELISA à partir du sérum et du lactosérum sur la numération des varrons. *Annales de Recherche Vétérinaire*, **16**: 335-343.
- BOULARD, C. (1989). Degradation of bovine C3 by serine proteases from parasites *Hypoderma lineatum* (Diptera, Oestridae). *Veterinary Immunology and Immunopathology*, **20**: 387-398.
- BOULARD, C.; ARGENTÉ, G.; HILLION, E. (1988). Hypodermose bovine. 1^e partie: description et incidence économique. *Le Point Vétérinaire*, **20**: 17-27.
- BOULARD, C.; ARGENTE, G.; HILLION, E. (1991). Effects indésirables ds antiparasitaires (hypersensibilité). *Recueil de Médecine Vétérinaire*, **167**:1127-1132.
- BOULARD, C.; BENCHARIF, F. (1984). Changes in the haemolytic activity of bovine serum complement by *Hypoderma lineatum* (Insecta, Oestridae) larval proteinases in native and immune cattle. *Parasite Immunology*, **6**: 459-467.
- BOULARD, C.; GARRONE, R. (1978). Characterization of a collagenolytic enzyme from larvae of *Hypoderma lineatum* (Insecta: Diptera, Oestriiform). *Comparative Biochemistry and Physiology*, **59**: 251-255.
- BOULARD, C.; LECROISEY, A. (1982). Specific antisera produced by direct immunization with slices of polyacrylamide gel containing small amounts of protein. *Journal of Immunological Methods*, **50**: 221-226.
- BOULARD, C.; SORIA, J.; SORIA, C. (1970). Possibility to use passive hemagglutination test for diagnosis of hypodermosis, using as antigen a raw collagenase extracted from 1st stage larvae of *Hypoderma lineatum*. *Comptes*

rendus hebdomadaires des séances de l'Académie des sciences. Série D : Sciences naturelles, **270** : 1965-1968.

- BOULARD, C.; WEINTRAUB, J. (1973). Immunological responses of rabbits artificially infested with the cattle grubs *Hypoderma bovis* (L.) and *H. lineatum* (De Vill.) (Diptera: Oestridae). *International Journal for Parasitology*, **3**: 379-386.
- BOWLES, V. M.; MEEUSEN, E. N.; CHANDLER, K.; VERLANGEN, A.; NASH, A. D.; BRANDON, M. R. (1994). The immune response of sheep infected with larvae of the sheep blowfly *Lucilia cuprina* monitored via efferent lymph. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, **40**: 341-352.
- BRAKE, D.K.; DE LEÓN, A.A. (2012). Immunoregulation of bovine macrophages by factors in the salivary glands of *Rhipicephalus microplus*. *Parasites and Vectors*, **5**: 38-45.
- BRANDTZAEG, P. ; DALE, I. ; GABRIELSEN, T.O. (1992). The leucocyte protein L1 (calprotectin): usefulness as an immunohistochemical marker antigen and putative biological function. *Histopathology*, **21**: 191-196.
- BROWN, W.C.; RICE-FICHT, A.C.; ESTES, D.M. (1998). Bovine type 1 and type 2 responses. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, **63**: 45-55.
- BROWN, W.C.; WOODS, V.M.; CHITKOMCKOWN C.G.; HASH, S.M.; RICE-FICHT, A.C. (1994). Interleukin-10 is expressed by bovine type 1 helper, type 2 helper, and unrestricted parasite-specific T-cell clones and inhibits proliferation of all three subsets in an accessory-cell-dependent manner. *Infection and Immunity*, **62**: 4697-4708.
- BROWN, W.C.; RICE-FICHT, A.C.; ESTES, D.M. (1998). Bovine type 1 and type 2 responses. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, **63**: 45-55.
- BUSTIN, S.A. (2000). Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of Molecular Endocrinology*, **25**: 169-193.

- BUSTIN, S.A.; NOLAN, T. (2004). Pitfalls of quantitative real-time reverse-transcription polymerase chain reaction. *Journal of Biomolecular Techniques*, **15**: 155–166.
- CABANELAS, E. (2013). *Desarrollo de un test ELISPOT para la detección de citoquinas en ganado vacuno infestado por Hypoderma*. Memoria de Licenciatura. Facultad de Veterinaria. Universidad de Santiago de Compostela.
- CABANELAS, E.; MONTERO, M.; LÓPEZ, C.; DÍAZ, P.; PÉREZ-CREO, A.; MORRONDO, P.; DÍEZ-BAÑOS, P.; PANADERO, R. (2013). Evolution of morphological features in subcutaneous *Hypoderma larvae* and its usefulness as indicators of larval maturity. XVIII Congreso De la Sociedad Española de Parasitología (SOCEPA); Gran Canaria, 17-20 de Septiembre de 2013.
- CANTON, G.J.; KONRAD, J.L.; MOORE, D.P.; CASPE, S.G.; PALAREA-ALBALADEJO, J.; CAMPERO, C.M.; CHIANINI, F. (2014). Characterization of immune cell infiltration in the placentome of water buffaloes (*Bubalus bubalis*) infected with *Neospora caninum* during pregnancy. *Journal of Comparative Pathology*, **150**: 463–468.
- CARBALLO, D. (1999). *Valoración mediante ELISA e inmunoelectrotransferencia de un antígeno recombinante para el diagnóstico de la hipodermosis bovina*. Memoria de Licenciatura. Facultad de Veterinaria. Universidad de Santiago de Compostela.
- CASAI, R.; MARTÍN ALONSO, J.M.; BOGA, J.A.; PARRA, F. (1998). *Hypoderma lineatum*: expression of enzymatically active hipodermin C in *Escherichia coli* and its use for the immunodiagnosis of hypodermosis. *Experimental Parasitology*, **90**: 14-19.
- CHABAUDIE, N. (1987). *Mise en évidence de l'activité anti-inflammatoire des enzymes d'hypoderme à l'aide d'un modèle murin*. Memoria para la obtención del Diplôme d'Etudes approfondies, especialidad: biofísicoquímica y biología celular y molecular. Universidad de Tours.
- CHABAUDIE, N. (1990). *Action des hypodermes sur le système immunitaire bovin*. Tesis doctoral. Facultad de Farmacia de Tours.

- CHABAUDIE, N.; BOULARD, C. (1992). Effect of hypodermin A, an enzyme secreted by *Hypoderma lineatum* (Insect Oestridae), on the bovine immune system. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, **31**: 167-177.
- CHABAUDIE, N.; BOULARD, C. (1993). *In vitro* and *ex vivo* responses of bovine lymphocytes to hypodermin C, an enzyme secreted by *Hypoderma lineatum* (Insect Oestridae). *Veterinary Immunology and Immunopathology*, **36**: 153-162.
- CHABAUDIE, N.; VILLEJOUBERT, C.; BOULARD, C. (1991). The response of cattle vaccinated with hypodermin A to a natural infestation of *Hypoderma bovis* and *Hypoderma lineatum*. *International Journal for Parasitology*, **21**: 859-862.
- CHAUVIN, A. (1987). Application de la méthode immunoenzymatique ELISA au diagnostic de l'hypodermose bovine. Tesis Doctoral. Facultad de Medicina de Nantes.
- CHEN, R.J.; HU, A.; YUAN, H.; WANG, Z.; JI, D.; WU, L.; ZHANG, T.; ZHU, Y.; SUN, W.; ZHU, X. (2014). The immunosuppression mechanism of hypodermin A on complement. *Parasitology International*, **63**: 392-396.
- CHEN, Q.; CHEN, R.; LIU, J.; YUAN, H.; LIU, P.; HU, A.; WU, L.; FANG, L.; XIAO, S.; ZHU, X. (2015). Hypodermin A, a potential agent for prevention of allogeneic acute rejection. *Transplant Immunology*, **33**: 198-203.
- CHITKOMCKOWN, C.G.; RUEF, B.J.; RICEFICHT, A.C.; BROWN, W.C.(1995). Interleukin-10 down-regulates proliferation and expression of interleukin-2 receptor p55 chain and interferon-gamma, but not interleukin-2 or interleukin-4, by parasite-specific helper T-cell clones obtained from cattle chronically infected with *Babesia bovis* or *Fasciola hepatica*. *Journal of Interferon and Cytokine*, **15**: 915-922.
- COGLEY, T.P.; ADERSON, J.R. (1981). Invasion of black-tailed deer by nose bot fly larvae (Diptera: Gasterophilidae) in the equine oral cavity. *International Journal for Parasitology*, **12**: 473-480.
- COLWELL, D.D. (1985). Cellular immunity in warble grub infestations: eosinophil responses to invading and migrating larvae. *Research Highlights*, **86**: 44-46.

- COLWELL, D.D. (1989). Scanning electron microscopy of the posterior spiracles of cattle grubs *Hypoderma bovis* and *Hypoderma lineatum*. *Medical and Veterinary Entomology*, **3**: 391-398.
- COLWELL, D.D. (1991). Ultrastructure of the integument of first-instar *Hypoderma lineatum* and *H. bovis* (Diptera: Oestridae). *Journal of Medical Entomology*, **28**: 86-94.
- COLWELL, D.D. (2011). Hidden antigens from third instar *Hypoderma lineatum*: Impact of immunization on larval survival in artificial infestations. *Veterinary Parasitology*, **175**: 313-319.
- COLWELL, D.D.; BARON, R.W. (1990). Early detection of cattle grub (*Hypoderma lineatum* and *H. bovis*) (Diptera, Oestridae) using ELISA. *Medical and Veterinary Entomology*, **4**: 35-42.
- COLWELL, D.D.; BERRY, N.M. (1993). Tarsal sensilla of the warble flies *Hypoderma bovis* and *H. lineatum* (Diptera: Oestridae). *Annals of the Entomological Society of America*, **86**: 756-765.
- COLWELL, D.D.; OTRANTO, D. (2006). Cross-transmission studies with *Hypoderma lineatum* de Vill. (Diptera: Oestridae): Attempted infestation of goats (*Capra hircus*). *Veterinary Parasitology*, **141**: 302-306.
- COLWELL, D.D.; LÓPEZ, C.; DíEZ-BAÑOS, P.; MORRONGO, P.; PANADERO, R. (2008). Impact of previous infestation on dynamics of circulating hypodermin C in cattle artificially infested with *Hypoderma lineatum* (Diptera: Oestridae). *Veterinary Parasitology*, **154**: 114-121.
- COLWELL, D.D.; MARTÍNEZ-MORENO, F.J.; MARTÍNEZ-MORENO, A.; HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ, S.; DE LA FUENTE-LÓPEZ, C.; ALUNDA, J.M.; HALL, M.J. (1998). Comparative scanning electron microscopy of third-instar *Hypoderma* spp. (Diptera: Oestridae). *Medical and Veterinary Entomology*, **12**: 181-186.
- COLWELL, D.D.; PANADERO-FONTÁN R.; LÓPEZ-SANDEZ C.; PARRA-FERNÁNDEZ F.; PAZ-SILVA A.; SÁNCHEZ-ANDRADE R.; DíEZ-BAÑOS

- P. (2003). Effect of treatment on the dynamics circulating hypodermin C in cattle naturally infested with *Hypoderma lineatum* (Diptera: Oestridae). *Veterinary Parasitology*, **113**: 263-272.
- CORDERO DEL CAMPILLO, M. (1962). Ensayos con “Neguvón” y “Trolene” sobre ganado vacuno. *Anales de la Facultad de Veterinaria de León*, VIII: 11-37.
- COONS, A.H.; LEDUC, E.H.; CONNOLLY, J.M. (1955). Studies on antibody production. I: A method for the histochemical demonstration of specific antibody and its application to a study of the hyperimmune rabbit. *The Journal of Experimental Medicine*, **102**: 49–60.
- COUSSENS, P.M.; VERMAN, N.; COUSSENS, M.A.; ELFTMAN, M.D.; MCNULTY, A.M. (2004). Cytokine gene expression in peripheral blood mononuclear cells and tissues of cattle infected with *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis evidence for an inherent proinflammatory gene expression pattern. *Infection and Immunity*, **72**: 1409–1422.
- COX, D.D. ; MOZIER, J.O. ; MULLEE, M.T. (1970). Posterior paralysis in a calf caused by cattle grubs (*Hypoderma bovis*) after treatment with systemic insecticide for grub control. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, **157**: 1088-1092.
- COX, J. ; FERRARI, G. ; JANETZKI, S. (2006). Measurement of cytokine release at the single cell level using the ELISPOT assay. *Methods*, **38**: 274–282.
- CURRIER, J.R.; KUTA, E.G.; TURK, E.; EARHART, L.B.; LOOMISPRICE, L.; JANETZKI, S.; FERRARI, G.; BIRX, D.L.; COX, J.H. (2002). A panel of MHC class I restricted viral peptides for use as a quality control for vaccine trial ELISPOT assays. *Journal of Immunological Methods*, **260**: 157-172.
- CROWTHER, M.; GOODALL, S.; JONES, J.L.; BELL, P.R.F.; THOMPSON, M.M. (2000). Localization of matrix metalloproteinase 2 within the aneurysmal and normal aortic wall. *British Journal of Surgery*, **87**: 1391-1400.
- CZERKINSKI, C.; ANDERSSON, H.; NILSSON, L.A.; KLARESKOG, L.; OUCHTERLONY, O. (1988). Reverse ELISPOT assay for clonal analysis of

- cytokine production. Enumeration of gamma-interferon-secreting cells. *Journal of Immunological Methods*, **110**: 29-36.
- D'ANDREA, A.; ASTE-AMEZAGA, M.; VALIANTE, N.M.; MA, X.; KUBIN, M.; TRINCHIERI, G. (1993). Interleukin 10 (IL-10) inhibits human lymphocyte interferon gamma-production by suppressing natural killer cell stimulatory factor/IL-12 synthesis in accessory cells. *The Journal of Experimental Medicine*, **178**: 1041-1048.
- DACAL, V. (2006). *Producción de Interferón Gamma por linfocitos estimulados con antígeno de Hypoderma lineatum*. Memoria de Licenciatura. Facultad de Veterinaria. Universidad de Santiago de Compostela.
- DACAL, V.; COLWELL, D.D.; LÓPEZ, C.; PÉREZ, V.; VÁZQUEZ, L.; CIENFUEGOS, S.; DÍAZ, P.; MORRONDO, P.; DÍEZ-BAÑOS, P.; PANADERO, R. (2009). Local and systemic cytokine responses during larval penetration in cattle experimentally infested with *Hypoderma lineatum* (Diptera: Oestridae). *Veterinary Immunology and Immunopathology*, **131**: 59-64.
- DACAL, V.; LÓPEZ, C.; COLWELL, D.D.; VÁZQUEZ, L.; DÍAZ, P.; MORRONDO, P.; DÍEZ, P.; PANADERO, R. (2011). Immunohistochemical characterization of inflammatory cells in the skin of cattle undergoing repeated infestations with *Hypoderma lineatum* (Diptera: Oestridae). *Journal of Comparative Pathology*, **145**: 282-288.
- DE GROOTE, D.; ZANGERLE, P.F.; GEVAERT, Y. (1992). Direct stimulation of cytokines (IL-1 α , TNF- α , IL-6, IL-2, INF- α and GM-CSF) in whole blood: comparison with isolated PBMC stimulation. *Cytokine*, **4**: 239-248.
- DE SMEDT, T.; VAN MECHELEN, M.; DE BECKER, G.; URBAIN, J.; LEO, O.; MOSER, M. (1997). Effect of interleukin-10 on dendritic cell maturation and function. *European Journal of Immunology*, **27**: 1229-1235.
- DHAS, D.B.B.; BHAT, B.V.; GANE, D.B. (2012). Role of calprotectin in infection and inflammation. *Current Pediatric Research*, **16**: 83-94.

- DÍAZ, I.; MATEU, E. (2005). Use of ELISPOT and ELISA to evaluate IFN- γ , IL-10 and IL-4 responses in conventional pigs. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, **106**: 107-112.
- DÍEZ, P.; PANADERO, R.; MORRONGO, P.; LÓPEZ, C.; DÍEZ, N. (1995). Hipodermosis. *Bovis (Tratado de Veterinaria Práctica)*, **65**: 90.
- DING, Y.; QIN, L.; KOTENKO, S.V.; PESTKA, S.; BROMBERG, J.S. A single amino acid determines the immunostimulatory activity of interleukin 10. *Journal of Experimental Medicine*. **191**: 213-224.
- DOBY, J.M.; CERTAINES, J.; DEUNFF, J.; GUIGUEN, C.; AUVRAY, E. (1982). Hypodermose humaine el IgE sériques totales. Résultats de l'étude de plus de 125 sérums en provenance de 66 cas. *Médecine et Maladies Infectieuses*, **13**: 174-178.
- DOBY, J.M.; QUILICI, M.; MARY, C.; DEUNFF, J. (1987). Valeur comparée de l'immunoélectrophorèse et de l'ELISA dans le diagnostic sérologique de l'hypodermose humaine. *Pathologie and Biologie*, **35**: 381-385.
- DOHERTY, M.; DEMISSIE, A.; MENZIES, D.; ANDERSEN, P. ; ROOK, G. ; ZUMLA, A. (2005). Effect of sample handling on analysis of cytokine responses to *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples using ELISA, ELISPOT and quantitative PCR. *Journal of Immunological Methods*, **298**: 129– 141.
- DOMINGUES, R; WOHLRES-VIANA, S.; REIS, D.R.L.; TEIXEIRA, H.C.; FERREIRA, A. P.; GUIMARAES, S.E.F.; PRATA, M.C.A; FURLONG, J.; VERNEQUE, R.S.; MACHADO, M.A. (2014). Expression of immune response genes in peripheral blood of cattle infested with *Rhipicephalus microplus*. *Genetics and Molecular Research*, **13**: 4013-4021.
- DRUMMOND, R.O. (1987). Economic aspects of ectoparasites of cattle in North America. Pp 9-24. In: Leaning, W.H.D., and J. Guerrero (eds.), The Economic Impact of Parasitism in Cattle. Proc. Of the MSD AGVET Symposium, in association with the XXIII World Veterinary Congress, Montreal, Canada, August 19, 1987.

- DURIN, L.; PÉRÈS, G. (1953). Lésions médullaires graves causes par del larves d'hypodermose sur un taureau. *Bulletin de la Société des Sciences Vétérinaires de Lyon*, **1**: 111-112.
- ELHAY, M.J.; HANRAHAN, C.F.; BOWLES, V.M.; SEOW, H.F.; ANDREWS, A.E.; NASH, A.D. (1994). Cytokine mRNA expression in skin in response to ectoparasite infection. *Parasite Immunology*, **16**: 451-458.
- ELIAS, J.M. (2003). Immunohistochemical methods. *In*: Immunohistopathology. A Practical Approach to Diagnosis, ed. Elias JM, 2nd ed., pp. 1-110. ASCP Press, Chicago, IL, 2003.
- ELKINGTON, R.A.; HUMPHRIES, M.; COMMINS, M.; MAUGERI, N.; TIERNEY, T.; MAHONY, T.J. (2009). A *Lucilia cuprina* excretory-secretory protein inhibits the early phase of lymphocyte activation and subsequent proliferation. *Parasite Immunology*, **31**: 750-765.
- EVSTAF'EV, M.N. (1980). Role of immunity in hypodermiasis in cattle. *Parazitologiya*, **14**: 197-205.
- EYRE, P.; BOULARD, C.; DELINE, T.R. (1981). Reaginic (type I anaphylactic) antibodies produced by calves in responses to *Hypoderma* larvae. *The Veterinary Record*, **107**: 280-281.
- FAVRE, N.; BORDMANN, G.; RUDIN, W. (1997). Comparison of cytokine a, measurements using ELISA, ELISPOT and semi-quantitative RT-PCR. *Journal of Immunological Methods*, **204**: 57-66.
- FERREIRA, B.R.; SILVA, J.S. (1998). Saliva of *Rhipicephalus sanguineus* tick impairs T cell proliferation and interferon gamma induced macrophage microbicidal activity. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, **64**: 279-293.
- FISHER, W.F.; PRUETT, J.H.; HOWARD, V.H.; SCHOLL, P.J. (1991). Antigen specific lymphocyte proliferative responses in vaccinated and *H. lineatum* infested calves. *Veterinary Parasitology*, **40**: 1-2, 135-145.

- FONG, T.A.; MOSMANN, T.R. (1990). Alloreactive murine CD8⁺ T cell clones secrete the Th1 pattern of cytokines. *Journal of Immunology*, **144**: 1744-1752.
- FREEMAN, W.M.; WALKER, S.J.; VRANA, K.E. (1999). Quantitative RT-PCR: pitfalls and potential. *Biotechniques*, **26**: 112-115.
- FUERTES, M.; MANGA-GONZÁLEZ, Y.; BENAVIDES, J.; GONZÁLEZ-LANZA, C.; GIRÁLDEZ, F.J.; MEZO, M.; GONZÁLEZ-WARLETA, M.; FERNÁNDEZ, M.; REGIDOR-CERRILLO, J.; CASTAÑO, P.; ROYO, M.; ORTEGA-MORA, L.; PÉREZ, V.; FERRERAS, M.C. (2015). Immunohistochemical study and mRNA cytokine profile of the local immune response in cattle naturally infected with *Calicophoron daubneyi*. *Veterinary Parasitology*, **214**: 178–183.
- FUKIWARA, N.; KOBAYASHI, K. (2005). Macrophages in inflammation. Current Drug Targets inflammation. *Allergy*, **4**: 281-286.
- FUNG, K.M.; MESSING, A.; LEE V.M.Y.; TROJANOWSKI, J.Q. (1992). A novel modification of the avidin–biotin complex method for immunohistochemical studies of transgenic mice with murine monoclonal antibodies. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, **40**:1319–1328.
- GIBSON, U.E.; HEID, C.A.; WILLIAMS, P.M. (1996). A novel method for real-time quantitative RT-PCR. *Genome Research*, **6**: 995–1001.
- GIL-COLLADO, M. (1961). Insectos y ácaros de los animals domésticos. Edit. Salvat, Barcelona.
- GINGRICH, R.E. (1980). Differentiation of resistance in cattle to larval *Hypoderma lineatum*. *Veterinary Parasitology*, **7**: 243-254.
- GINGRICH, R.E. (1982). Acquired resistance to *Hypoderma lineatum*: Comparative immune response of resistant and susceptible cattle. *Veterinary Parasitology*, **9**: 233-242.

- GINN, P.; MANSELL, J.E.K.L.; RAKICH, P.M. (2007). Skin and appendages. In: Pathology of Domestic Animals, 5th Edition. Ed: M. G. Maxie. Saunders Elsevier, Edinburgh, U.K. pp. 714-715.
- GIULIETTI, A.; OVERBERGH, L.; VALCKX, D.; DECALLONNE, B.; BOUILLON, R.; MATHIEU, C. (2001). An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression. *Methods*, **25**: 386–401.
- GODON, C. (1994). *Mise au point d'une technique d'exploration des cellules de la réponse inflammatoire précoce chez le bovin parasite par Hypoderma lineatum*. Memoria para la obtención del Diplôme d'Etudes approfondies, especialidad: inmunología. Paris.
- GOFF, W.L.; O'ROURKE, K.I.; JOHNSON, W.C.; LACY, P.A.; DAVIS, W.C.; WYATT, C.R. (1998). The role of IL-10 in iNOs and cytokine mRNA expression during in vitro differentiation of bovine mononuclear phagocytes. *Journal of Interferon and Cytokine*, **18**: 139-149.
- GOLBAR, H.M.; IZAWA, T.; JUNIANTITO, V.; ICHIKAWA, C.; TANAKA, M.; KUWAMURA, M.; YAMAT, J. (2013). Immunohistochemical characterization of macrophages and myofibroblasts in fibrotic liver lesions due to *Fasciola* infection in cattle. *Journal of Veterinary Medicine Science*, **75**: 857–865.
- GONZÁLEZ, D.D.; RIMONDI, A.; PÉREZ AGUIRREBURUALDE, M.S.; MOZGOVOJ, M.; BELLIDO, D.; WIGDOROVITZ, A.; DUS SANTOS, M.J. (2013). Quantitation of cytokine gene expression by real time PCR in bovine milk and colostrum cells from cows immunized with a bovine rotavirus VP6 experimental vaccine. *Research in Veterinary Science*, **95**: 703–708.
- GUERKOV, R.E.M.; TARGONI, O.S.; KREHER, C.R.; BOEHM, B.O.; HERRERA, M.T.; TARY-LEHMAN, M.; LEHMAN, P.V.; SCHWANDER, S.K. (2003). Detection of low-frequency antigen-specific IL-10-producing CD4 (+) T cells via ELISPOT in PBMC: cognate vs. nonspecific production of the cytokine. *Journal of Immunological Methods*, **279**: 111-121.
- HADWEN, S.; BRUCE, E. A. (1916). Observations on the migration of warble larvae through the tissues (No. 22). Government Printing Bureau.

- HADWEN, S.; FULTON, J.S. (1924). On the migration of *Hypoderma lineatum* from the skin to the gullet. *Parasitology*, **16**: 98-106.
- HAYAT, M.A. (2002). Antigens and antibodies. *In*: Microscopy, Immunohistochemistry, and Antigen Retrieval Methods for Light and Electron Microscopy, ed. Hayat MA, pp. 31–51. Kluwer Academic, New York, NY, 2002.
- HEID, C.A.; STEVENS, J.; LIVAK, K.J.; WILLIAMS, P.M. (1996). Real time quantitative PCR. *Genome Research*, **6**: 986–994.
- HERR, W.; SCHNEIDER, J.; LOHSE, A.W.; ZUMBUSCHENFELDE, K.H.M.; WOLFEL, T. (1996). Detection and quantification of blood-derived CD8 (+) T lymphocytes secreting tumor necrosis factor alpha in response to HLA-A2.1-binding melanoma and viral peptide antigens. *Journal of Immunological Methods*, **191**: 131-142.
- HOLLAND, P.M.; ABRAMSON, R.D.; WATSON, R.; GELFAND, D.H. (1991). Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'–3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.*, **88**: 7276–7280.
- HOPE, J.C.; KWONG, L.S.; THOM, M.; SOPP, P.; MWANGI, W.; BROWN, W.C.; PALMER, G.H.; WATTEGEDERA, S.; ENTRICAN, G.; HOWARD, C.J. (2005). Development of detection methods for ruminant interleukin (IL)-4. *Journal of Immunological Methods*, **301**: 114-123.
- HU, A.K.; CHEN, R.J.; ZHU, X.R.; GU, J.H.; LIU, Z.P. (2014). Immunosuppressive effect of hypodermin C on complement component 3 in vitro. *Cell Biochemistry and Biophysics*, **72**: 93-98.
- HUANG S.N. (1975). Immunohistochemical demonstration of hepatitis B core and surface antigens in paraffin sections. *Laboratory Investigation*, **33**: 88–95.
- HUGGETT J.; DHEDA, K.; BUSTIN, S.; ZUMLA, A. (2005). Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. *Genes and Immunity*, **6**: 279–284.

- HURTADO, F.J. (1999). *Establecimiento de las bases epidemiológicas, clínicas e inmunológicas de la hipodermosis bovina en Extremadura (España)*. Tesis Doctoral. Facultad de Veterinaria. Universidad de Extremadura.
- ISHIGURO, T.; SAITOH, J.; YAWATA, H.; YAMAGISHI, H.; IWASAKI, S.; MITOMA, Y. (1995). Homogeneous quantitative assay of hepatitis C virus RNA by polymerase chain reaction in the presence of a fluorescent intercalater. *Analytical Biochemistry*, **229**: 207-213.
- JANETZKI, S.; SCHAEDE, S.; BLACHER, N.E.B.; BEN-PORAT, L.; HOUGHTON, A.N.; PANAGEAS, K.S. (2004). Evaluation of Elispot assays: influence of method and operator on variability of results. *Journal of Immunological Methods*, **291**: 175-183.
- KARTER, A.J.; FOLSTAD, I.; ANDERSON, J.R. (1992). A biotic factors influencing embryonic development egg hatching and larval orientation in the reindeer warble fly *Hypoderma tarandi*. *Medical and Veterinary Entomology*, **6**: 355-362.
- KARLSSON, A.; MARTIN, J.; YOUNGER, S.; BREDET, B.; EPLING, L.; RONQUILLO, R.; VARMA, A.; DEEKS, S.; McCUNE, J.; NIXON, D.; SINCLAIR, E. (2003). Comparison of the ELISPOT and cytokine flow cytometry assays for the enumeration of antigen-specific T cells. *Journal of Immunological Methods*, **283**: 141– 153.
- KASTING, R.; MCGINNIS, J.A. (1966). Amino Acid requeriments of *Hypoderma bovis* (L.) determined with glucose-U14C. *Experimental Parasitology*, **19**: 249-253.
- KEEFE, R.G.; FERRICK, D.A.; STOTT, J.L. (1997). Cytokine transcription in lymph nodes of cattle in different stages of bovine leukemia virus infection. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, **59**: 271-283.
- KELLOGG, D.E.; RYBALKIN, I.; CHEN, S.; MUKHAMEDOVA, N.; VLASIK, T.; SIEBERT, P.D.; CHENCHIK, A. (1994). TaqStart Antibody: "hot start" PCR facilitated by a neutralizing monoclonal antibody directed against Taq DNA polymerase. *Biotechniques*, **16**: 1134-1137.

- KHAN, M.A. (1971). Some factors involved in systemic insecticide toxicosis: esophageal lesions in heifers treated with coumaphos, crufonate and trichlorfon. *Canadian Journal of Animal Science*, **51**: 411-417.
- KHAN, M.A. (1981). An intradermal test to detect latent warble (*Hypoderma* spp.) infection in cattle. *Canadian Veterinary Journal*, **22**: 36-41.
- KHAZNADJI, E.; BOULARD, C.; MOIRÉ, N. (2003). Expression of functional hypodermin A, a serine protease from *Hypoderma lineatum*, in Schneider 2 cells. *Experimental Parasitology*, **104**: 33-39.
- KIPAR, A.; SCHILLER, I.; BAUMGÄRTNER, W. (2003). Immunopathological studies on feline cutaneous and (muco) cutaneous mycobacteriosis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, **91**: 169-182.
- KONNAI, S.; USUI, T.; OHASHI, K.; ONUMA, M. (2003). The rapid quantitative analysis of bovine cytokine genes by real-time RT-PCR. *Veterinary Microbiology*, **94**: 283-294.
- KOPECKY, J.; KUTHEJLOVÁ, M.; PECHOVÁ, J. (1999). Salivary gland extract from *Ixodes ricinus* ticks inhibits production of interferon gamma by the upregulation of interleukin-10. *Parasite Immunology*, **21**: 351-356.
- KOVÁR, L.; KOPECKY, J.; RIHOVA, B. (2002). Salivary gland extract from *Ixodes ricinus* tick modulates the host immune response towards the Th2 cytokine profile. *Parasitology Research*, **88**: 1066-1072.
- KREUZER, K.N. (2000) Recombination-dependent DNA replication in phage T4. *Trends in Biochemistry Science*, **25**: 165-173.
- KUSHIBIKI, S. (2011). Tumor necrosis factor-alpha-induced inflammatory responses in cattle. *Animal Science Journal*, **82**: 504-511.
- LAEMMLI, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. *Nature*, **227**: 680-685.
- LAPAGE, G. (1968). Veterinary Parasitology. Edinburgh, Oliver and Boyd Edit, pp. 511-524.

- LECROISEY, A.; GILLES, A.M.; DE WOLF, A.; KEIL, B. (1987). Complete amino acid sequence of the collagenase from the insect *Hypoderma lineatum*. *Journal of Biological Chemistry*, **262**: 7546-7551.
- LECROISEY, A.; TONG, N.T.; KEIL, B. (1983). Hypodermin B a trypsin-related enzyme from the insect *Hypoderma lineatum*. Comparison with Hypodermin A and *Hypoderma* collagenase, two serine proteases from the same source. *European Journal of Biochemistry*, **134**: 261-267.
- LEHMANN, P.V.; ZHANG, W. (2012). Unique strengths of ELISPOT for T-cell diagnostics. Editado por: KALYUZHNY, A.E. En: *Handbook of ELISPOT (Methods and Protocols)*. 2ª edición. Springer. New York, pp. 65-74.
- LELLO, E.; ROSIS, M.B. (2003). Inflammatory reaction to the human bot-fly, *Dermatobia hominis*, in infested and reinfested mice. *Medical and Veterinary Entomology*, **17**: 55-60.
- LENG, S. X.; MCELHANEY, J.E.; WALSTON, J.D.; XIE, D.X.; FEDARKO, N.S.; KUCHEL, G.A. (2008). ELISA and multiplex technologies for cytokine measurement in inflammation and aging research. *Journals of Gerontology series a-biological sciences and Medical Sciences*, **63**: 879-884.
- LEVASSEUR, G. (1991). Incidents dus à *Hypoderma lineatum*, lors du traitement précoce du varron. *Bulletin des G.T.V.*, 6B: 189-191.
- LI, X. Y.; LIU, X. H; GE, Y.Q.; ZHANG, D. (2015). Scanning electron microscopy of antennal sensory organs of the cattle grub, *Hypoderma lineatum* (Diptera: Oestridae). *Parasitology Research*, **114**: 3865-3871.
- LÓPEZ, C.; COLWELL, D.D.; PANADERO, R.; PAZ, A.; PÉREZ, J.; MORRONDO, P.; DÍEZ, P.; CASCALLANA, J.P.; SANTAMARÍA, V.; BRAVO, A. (2005). Skin immune responses in cattle after primary and secondary infections with *Hypoderma lineatum* (Diptera: Oestridae) larvae. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, **108**: 285-294.

- LÓPEZ, C.; PANADERO, R.; LEIS, H.; MORRONDO, P.; BRAVO, A.; DÍEZ, P. (1999a). Estudio anatomopatológico del tejido subcutáneo en bovinos infestados por *Hypoderma* spp. VI Congreso Ibérico de Parasitología: 140.
- LÓPEZ, C.; PANADERO, R.; LEIS, H.; MORRONDO, P.; BRAVO, A.; DÍEZ, P. (1999b). Cambios histopatológicos en la submucosa esofágica de bovinos infestados por *Hypoderma lineatum*. VI Congreso Ibérico de Parasitología: 143.
- LUCOCQ, J.M.; ROTH, J. (1985). Colloidal gold and colloidal silver-metallic markers for light microscopic histochemistry. In: Immunocytochemistry, eds. Bullock GR and Petrusz P, pp. 203–236. Academic Press, New York, NY.
- MADEL, G.; NAHIF, A.A. (1971). Zur Entwicklung, Histologie und Sekretion der larvalen Speicheldrüsen der Ziegenderasselfliege *Crivellia silenus* Brauer (Diptera, Hypodermatidae). *Zentralblatt für Parasitenkunde*, **37**: 211-225.
- MAGAT, A.; BOULARD, C. (1970). Essais de vaccination contre l'hypodermose bovine avec un vaccin contenant une collagénase brute extraite des larves de 1^{re} stade d'*Hypoderma lineatum*. *Comptes Rendus de l'Academie des Sciences, Paris*, **270**: 728-730.
- MAIZELS, R.M.; YAZDANBAAKHSH, M. (2003). Immune regulation by helminth parasites: cellular and molecular mechanisms. *Immunology*, **3**: 733-744.
- MALASSAGNE, B.; RÉGIMBEAU, J.M.; TABOIT, F.; TROALEN, F.; CHE´REAU, C.; MOIRÉ, N.; ATTAL, J; BATTEUX, F.; CONTI, F.; CALMUS, Y.; HOUSSIN, D.; BOULARD, C.; HOUDEBINE, L.M.; WEILL, B. (2003). Hypodermin A, a new inhibitor of human complement for the prevention of xenogeneic hyperacute rejection. *Xenotransplantation*, **10**: 267–277.
- MARCATO, A. (1990). Anatomía e histología patológica especial de los mamíferos domésticos. McGraw Hill, Madrid, 2º edición.
- MARTÍNEZ-GÓMEZ, F.; GASCA, A.; DE JUAN, F.; HERNÁNDEZ, S. (1991). Maternal anti-*Hypoderma* antibodies in calves. *Medical and Veterinary Entomology*, **5**: 381-383.

- MARTÍNEZ-GÓMEZ, L.; HERNÁNDEZ, S.; MORENO, T. (1988). Hipodermosis: Etiología. *Bovis*, **25**: 35-54.
- MARTÍNEZ-MORENO, F.J. (1992). *Estudio inmunológico de la hipodermosis bovina*. Tesis Doctoral. Facultad de Veterinaria. Universidad de Córdoba.
- MEHUS, A.; MUHONEN, W.; GARRETT, S.; SOMJI, S.; SENS, D.; SHABB, J. (2014) Quantitation of human metallothionein isoforms: a family of small, highly conserved, cysteine-rich proteins. *Molecular and Cellular Proteomics*, **13**: 1020-1033.
- MENA, A.; IOANNOU, X.; VAN KESSEL, A.; VAN DEN HURK, S.; POPOWYCH, Y.; BABIUK, L.A.; GODSON, D. (2002). Th1/Th2 biasing effects of vaccination in cattle as determined by real-time PCR. *Journal of Immunological Methods*, **263**: 11- 21.
- MIGHELL, A.J.; HUME, W.J.; ROBINSON, P.A. (1998). An overview of the complexities and subtleties of immunohistochemistry. *Oral Diseases*, **4**: 217–223.
- MILNES, A. S.; BAILEY, M.; KNOWLES, T.G.; COLES, G.C.; GREEN, L.G.; DAY, M.J. (2007). An immunohistochemical assessment of the cutaneous immune response to louse infestation in cattle. *Journal of Comparative Pathology*, **136**: 240-249.
- MO, X.Y.; SARAWAR, S.R.; DOHERTY, P.C. (1995). Induction of cytokines in mice with parainfluenza pneumonia. *Journal of Virology*, **69**: 1288–1291.
- MOIRÉ, N. (1998). Hypodermin A and inhibition of lymphocyte proliferation. *Parasitology today*, **14**: 455-457.
- MOIRÉ, N.; BIGOT, Y.; PERIQUET, G.; BOULARD, C. (1994). Sequencing and gene expression of hypodermins A, B, C in larval stages of *Hypoderma lineatum*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, **66**: 233-240.

- MOIRÉ, N.; NICOLAS-GAULARD, I.; LE VERN, Y.; BOULARD, C. (1997). Enzimatic effect of hypodermin A, a parasite protease, on bovine lymphocyte membrane antigens. *Parasite Immunology*, **19**: 21-27.
- MORRONGO, P. (1998). *Estudio sobre la hipodermosis bovina en Galicia mediante determinación sérica de anticuerpos frente a hipodermina C*. Memoria de Licenciatura. Facultad de Veterinaria. Universidad de León.
- MORRONGO, P.; DÍEZ, N.; LÓPEZ, C.; DÍEZ, P.; PANADERO, R. (1999). Estudio inmuno-epidemiológico de la hipodermosis bovina en Galicia. *Producción Animal*, **143**: 31-43.
- MOSMANN, T.R. (1994). Properties and functions of interleukin-10. *Advances in Immunology*, **56**: 1-26.
- MOSMANN, T.R.; CHERWINSKI, H.; BOND, M.W.; GIEDLIN, M.A.; COFFMAN, R.L. (1986). Two types of murine helper T cell clon. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *Journal of Immunology*, **136**: 2348-2357.
- NELSON, W.A. (1987). Other blood-sucking and myasis-producing arthropods. *Immune Responses in Parasitic Infections*, 4: *Protozoa, Arthropods and Invertebrates*, Ed. Soulsby C.R.C. Press, Boca Ratón, 175-209.
- NELSON, W.A.; WEINTRAUB, J. (1972). *Hypoderma lineatum* (De Vill.) (Diptera: Oestridae): Invasion of the bovine skin by newly hatched larvae. *Journal of Parasitology*, **58**: 614-624.
- NICOLAS-GAULARD, I.; MOIRÉ, N.; BOULARD, C. (1995). Effect of the parasite enzyme, hypodermin A, on bovine lymphocyte proliferation and interleukin-2 production via the prostaglandin pathway. *Immunology*, **84**: 160-164.
- ORYAN, A.; BAHRAMI, S. (2012). Pathology of natural *Przhevalskiana silenus* infestation in goats. *Tropical Biomedicine*, **29**: 524-531.
- OTRANTO, D. (2001). The immunology of myiasis: parasite survival and host defense strategies. *Trends in Parasitology*, **17**: 176-182.

- OUAISSI, A. (2007). Regulatory cells and immunosuppressive cytokines: parasite-derived factors induce immune polarization. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*; 94971: 10 pp.
- OVERBERGH, L.; GIULIETTI, A.; VALCKX, D.; DECALLONNE, B.; BOUILLON, R.; MATHIEU, C. (2003). The use of Real-Time Reverse Transcriptase PCR for the quantification of cytokine gene expression. *Journal of Biomolecular Techniques*, **14**: 33–43.
- OZAKI, K.; LEONARD, W.J. (2002). Cytokine and cytokines receptor pleiotropy and redundancy. JBC Papers in Press. *The Journal of Biological Chemistry*, **277**: 29355-29358.
- PANADERO, R. (1996). *Estudio epidemiológico y de la respuesta inmune frente a antígeno de Hypoderma lineatum como aportación a la lucha contra la hipodermosis bovina en Galicia*. Tesis Doctoral. Facultad de Veterinaria. Universidad de Santiago de Compostela.
- PANADERO, R.; LÓPEZ, C.; CARBALLO, D.; CASAIS, R.; PAZ, A.; MORRONDO, P.; DÍEZ-BAÑOS, P. (2000). Assessment of a recombinant antigen versus natural hypodermin C for the serodiagnosis of hypodermosis in cattle. *Parasitology Research*, **86**: 67-68.
- PANADERO, R.; LÓPEZ, C.; MEZO, M.; MORRONDO, P.; DÍEZ-BAÑOS, P. (1997). Effect of early treatment with ivermectin and doramectin on the dynamics of antibody response in cattle naturally infested by *Hypoderma lineatum* and *H. bovis*. *Veterinary Parasitology*, **73**: 325-334.
- PANADERO, R.; LÓPEZ, C.; PAZ, A.; DÍEZ-BAÑOS, N.; MORRONDO, P.; DÍEZ-BAÑOS, P. (2001). Dynamics of the antibody response in cattle infested by *Hypoderma* after a treatment with injectable and pour-on ivermectin. *Journal of Medical Entomology*, **38**: 603-605.
- PANADERO, R.; FERNÁNDEZ, M.; VÁZQUEZ, L.; LÓPEZ, C.; DACAL, V.; CIENFUEGOS, S.; DÍAZ, P.; MORRONDO, P.; DÍEZ-BAÑOS, P. (2007a). Occurrence and larval growth of *Hypoderma lineatum* in the oesophagi of cattle

- from northwest Spain: influence of geographical and climatic conditions. *Medical and Veterinary Entomology*, **21**: 225-230.
- PANADERO, R.; VÁZQUEZ, L.; COLWELL, D.D.; LÓPEZ, C.; DACAL, V.; MORRONDO, P.; DÍEZ-BAÑOS, P. (2007b). Evaluation of an antigen capture ELISA for the early diagnosis of *Hypoderma lineatum* in cattle under field conditions. *Veterinary Parasitology*, **147**: 297-302.
- PANADERO, R.; DACAL, V.; LÓPEZ, C.; VÁZQUEZ, L.; CIENFUEGOS, S.; DÍAZ, P.; MORRONDO, P.; DÍEZ-BAÑOS, P. (2009). Immunomodulatory effect of *Hypoderma lineatum* antigens: in vitro effect on bovine lymphocyte proliferation and cytokine production. *Parasite Immunology*, **31**: 72-77.
- PANADERO, R.; LÓPEZ, C.; DÍAZ, P.; MORRONDO, P.; DÍEZ-BAÑOS, P. (2011). Regulatory effect of the cytokines IFN- γ and IL-4 on cellular immune responses against *Hypoderma lineatum* antigens. XII Congreso Ibérico de Parasitología, Zaragoza. 5-8 de julio.
- PANADERO, R.; CABANELAS, E.; MONTERO, M.; LÓPEZ, C.; DÍAZ, P.; MORRONDO, P.; DÍEZ-BAÑOS, P. (2012). Emergence period of mature *Hypoderma lineatum* larvae in Northwestern Spain and its relation with early diagnosis and treatment. XXVII Congresso Nazionale de la Società Italiana di Parassitologia, Alghero: 119.
- PANADERO, R.; LÓPEZ, C.; VÁZQUEZ, L.; DÍAZ, P.; PÉREZ, A.; CABANELAS, E.; MORRONDO, P.; DÍEZ-BAÑOS, P. (2013). Effect of reinfestations on systemic immune responses in cattle naturally infested by *Hypoderma* sp. (Diptera: Oestridae). *Veterinary Parasitology*, **193**: 238-244.
- PANCIERA, R.J.; EWING, S.A.; JOHSON, E.M.; WHITENACK, D.L. (1993). Eosinophilic mediastinitis, myositis, pleuritis and pneumonia of cattle associated with migration of first-instar larvae of *Hypoderma lineatum*. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, **5**: 226-231.
- PELI, A.; SCAGLIARINI, A.; BRITTI, D.; BOARI, A. (2003). Detection of proinflammatory and regulatory cytokines in bovine milk using RT-PCR. *Veterinary Research Communications*, **27** : 779-781.

- PETITHORY, J.; BOULARD, C. (1979). Étude comparative des antigènes *H. bovis* et *H. lineatum* dans le diagnostic sérologique de l'hypodermose humaine. *Médecine et Maladies Infectieuses*, **9**: 393-396.
- PETROSYAN, K.; TAMAYO, R.; JOSEPH, D.: Sensitivity of a novel biotin-free detection reagent (Powervision+) for immunohistochemistry. *Journal of Histotechnology*, **25**: 247-250.
- PFADT, R.E. (1947). Effect of temperature and humidity on larval and pupal stages of the common cattle grub. *Journal of Economic Entomology*, **40**: 293-300.
- PFADT, R.E.; LLOYD, J.E.; SHARAFI, G. (1975). Pupal development of cattle grubs at constant and alternating temperatures. *Journal of Economic Entomology*, **68**: 325-328.
- PFAF, A.V.; KIRCH, A.K.; HOFFMANN, W.H.; BANLA, M.; SCHULZ-KEY, H.; GEIGER, S.M.; SOBOSLAY, P.T. (2003). Regulatory effects of IL-12 and IL-18 on *Onchocerca volvulus*- and *Entamoeba histolytica*-specific cellular reactivity and cytokine profiles. *Parasite Immunology*, **25**: 325-332.
- PFEFFER, M.; WIEDMANN, M.; BATT, C.A. (1995). Applications of DNA amplification techniques in veterinary diagnostics. *Veterinary Research Communications*, **19**: 375-407.
- PINILLA, G.; CUBILLOS, K.; RODRÍGUEZ, M. (2012). Bodas de plata de la reacción en cadena de la polimerasa. *NOVA Publicación Científica en Ciencias Biomédicas*, **6**: 101-112.
- POLAK, J.M.; VAN NOORDEN, S. (2003). Introduction to Immunocytochemistry, 3rd ed. Bios Scientific Publishers Ltd, Oxford, UK.
- PRIETO, M.; ESPI, M.; GARCIA, J.A.; PARRA, F. (1990). Effect of Ivermectin treatment on anti-hypodermin C Asturiana cattle naturally with *Hypoderma lineatum*. *Veterinary Parasitology*, **35**: 211-218.
- PRUETT, J.H. (1993). Proteolytic cleavage of bovine IgG by hypodermin A, a serine protease of *Hypoderma lineatum*. *Journal of Parasitology*, **79**: 829-833.

- PRUETT, J.H.; BARRETT, C.C. (1984). Induction of intradermal skin reactions in the bovine by fractionated proteins of *Hypoderma lineatum*. *Veterinary Parasitology*, **16**: 137-146.
- PRUETT, J.H.; BARRETT, C.C. (1985). Kinetic development of humoral anty-*Hypoderma lineatum* antibody activity in the serum of vaccinated and infested cattle. *The Southwestern Entomology*, **10**: 39-48.
- PRUETT, J.H.; BARRETT, C.C.; FISHER, W.F. (1987). Kinetics development of serum antibody to purified *Hypoderma lineatum* proteins in vaccinated and non-vaccinated cattle. *The Southwestern Entomology*, **12**: 79-88.
- PRUETT, J.H.; FISHER, W.F.; DELOACH, J.R. (1989). Dexamethasone-induced bovine T lymphocyte suppression and the effect upon susceptibility to sheep *Scabiei* mite (Acari: Psoroptidae) infestation. *Journal of Medical Entomology*, **82**: 17-179.
- PRUETT, J.H.; KUNZ, S.E. (1996). Warble stage development of third instars of *Hypoderma lineatum* (Diptera: Oestridae). *Journal of Medical Entomology*, **33**: 220-223.
- PRUETT, J.H.; TEMEYER, K.B. (1989). Colostral transfer of antibodies specific for *Hypoderma lineatum* proteins. *Veterinary Research Communications*, **13**: 213-223.
- PRUETT, J.H.; TEMEYER, K.B.; BURKETT, B.K. (1988). Antigenicity and immunogenicity of *Hypoderma lineatum* soluble proteins in the bovine host. *Veterinary Parasitology*, **29**: 53-63.
- QUINTERO-MARTÍNEZ, M.T.; NEGRETE, J.O.; BENÍTEZ, R.; MÉNDEZ, M.A.; JUÁREZ VEGA, G.; CRUZ-VÁZQUEZ, C. (2007). Presence of *Hypoderma lineatum* stage I larvae in the esophagus of cattle slaughtered in Chihuahua, Chih., México. *Veterinary Parasitology*, **146**: 189-191.
- R CORE TEAM. R: a language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria; 2015 URL <http://www.R-project.org>

- RAMACHANDRA, R.N.; WIKEL, S.K. (1992). Modulation of host-immune response by ticks (Acari, Ixodidae). Effect of salivary gland extracts on host macrophages and lymphocyte cytokine production. *Journal of Medical Entomology*, **29**: 818-826.
- RAMOS-VARA, J.A. (2005). Technical aspects of immunohistochemistry. *Veterinary Pathology*, **42**: 405-426.
- RAMOS-VARA, J.A.; BEISSENHERZ, M. (2000). Optimization of immunohistochemical methods using two different AR methods on formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: experience with 63 markers. *Journal of Veterinary Diagnosis Investigation*, **12**: 307-311.
- RAMPRASAD, M.P.; TERPSTRA, V.; KONDRATENKO, N.; QUEHENBERGER, O.; STEINBERG, D. (1996). Cell surface expression of mouse macrosialin and human CD68 and their role as macrophage receptors for oxidized low density lipoprotein. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)*; **93**: 14833-14838.
- RÉGIMBEAU, J.M.; MALASSAGNE, B.; TABOIT, F.; BOULARD, C.; HOUSSIN, D.; WEILL, B. (2001). Mise au point d'un modèle de coeur isolé perfusé. Application à l'étude de l'hypodermine A dans la prévention du rejet suraigu xénogénique. *Annales de Chirurgie*, **126**: 1007-1015.
- REINA, D.; MARTÍNEZ-MORENO, F.J.; MARTÍNEZ-MORENO, A.; MOLINA, J.M.; HERNANDEZ, S. (1994). Present status of warble fly in Extremadura (South-West of Spain). Editado por: PFISTER, K.; CHARBON, J.L.; TARRY, D.W.; PITHAN, K. En: *Improvements in Control Methods for Warble-fly in cattle and goats*. Comisión Europea, Thun: 59-64.
- RHODES, S.G.; GRAHAM, S.P. (2002). Is "timing" important for cytokine polarization?. *Trends in Immunology*, **23**: 246-249.
- RIETSCHER, G. (1979). Histologischereaktionen des wirtes auf den Befall durch die Dasselfliege *Oestromya leporine* Pall. (Diptera, Hypodermatidae). *Zentralblatt für Parasitenkunde*, **60**: 277-289.

- RINISLAND, F. H.; HELMS, T.; ASSAD, R.J.; BOEHM, B.O.; LEHMANN, M.T. (2000). Granzyme B ELISPOT assay for ex vivo measurements of T cell immunity. *Journal of Immunological Methods*, **240**: 143–155.
- RIRIE, K. M.; RASMUSSEN, R.P; WITTWER, C.T. (1997). Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Analytical Biochemistry*, **245**: 154-160.
- ROBERTSON, R.H. (1980). Antibody production in cattle infected with *Hypoderma* spp. *Canadian Journal of Zoology*, **58**: 245-251.
- ROMAGNANI, S. (1997). The Th1/Th2 paradigm. *Immunology Today*, **18**: 263-267.
- ROMANIUK, A. (1974). Neurochemical bases of defensive behaviour in animals. *Acta of Neurobiology Experimental*, **34**: 205-214.
- ROSSEN, L.; NORSKOV, P.; HOLSTROM, K.; RASMUSSEN, O.F. (1992). Inhibition of PCR by components of food samples, microbial diagnostic assays and DNA-extraction solutions. *International Journal of Food Microbiology*, **17**: 37-45.
- ROTHEL, J.S.; JONES, S.L.; CORNER, L.A.; COX, J.C.; WOOD, P.R. (1990). A sandwich enzyme-immunoassay for bovine interferon-gamma and its use for the detection of tuberculosis in cattle. *Australian Veterinary Journal*, **67**: 134-137.
- RUIZ, P. (1982). *Contribución al estudio de la hipodermosis en la provincia de Córdoba*. Memoria de Licenciatura. Facultad de Veterinaria. Universidad de Córdoba.
- SABATTINI, E.; BISGAARD, K.; ASCANI, S.; POGGI, S.; PICCIOLI, M.; CECCARELLI, C.; PIER, F.; FRATERNALI-ORCIONI, G.; PILERI, S.A. (1998). The EnVision_+ system: a new immunohistochemical method for diagnostics and research: critical comparison with the APAAP, ChemMate CSA, LABC, and SABC techniques. *Journal of Clinical Pathology*, **51**: 506–511.
- SANDEMAN, R.M.; BOWLES, V.M.; COLWELL, D.D. (2014). The immunobiology of myiasis infections – whatever happened to vaccination? *Parasite Immunology*, **36**: 605-615.

- SARAVANAN, B.C.; POUROUCHOTTAMANE, R.; RAMESHA, K.P.; BHATTACHARYA, M. (2006). A case of Hypoderma infestation in yak. *Indian Veterinary Journal*, **83**: 1105.
- SARRE, C. ; GONZALEZ-HERNANDEZ, A.; VAN COPPENOLLE, S.; GRIT, R.; GRAUWET, K.; VAN MEULDER, F.; CHIERS, K.; VAN DEN BROECK, W.; GELDHOF, P.; CLAEREBOU, E. (2015). Comparative immune responses against *Psoroptes ovis* in two cattle breeds with different susceptibility to mange. *Veterinary Research*, **46**: 131-141.
- SAKAMOTO, T.; CABREIRA, P.A. (2003). Immunohistochemical observations on cellular response in unilocular hydatid lesions and lymph nodes of cattle. *Acta Tropica*, **85**: 271-279.
- SCHARFF, D.K. (1950). Cattle grubs, their biologies, their distribution and experiments in their control. Technical Bulletin Montana State College, Agriculture Exp. Station, 471.
- SCHAUER, U.; JUNG, T.; KRUG, N.; FREW, A. (1996). Measurement of intracellular cytokines. *Immunology Today*, **17**: 305-306.
- SCHEERLINCK J.Y.; YEN, H.H. (2005). Veterinary applications of cytokines. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, **108**: 17-22.
- SCHOLL, P.J.; WEINTRAUB, J. (1988). Gonotrophic development in *Hypoderma lineatum* and *H. bovis* (Diptera: Oestridae) with notes on reproductive capacity. *Annals of the Entomological Society of America*, **81**: 315-324.
- SCHOLL, P.J.; SCHWINGHAMMER, K.A.; CHAMBERLAIN, W.F. (1989). Technique for age-grading late third-instar *Hypoderma lineatum* (Diptera: Oestridae). *Journal of Economic Entomology*, **26**: 230-233.
- SCHWINGHAMMER, K.A.; PRUETT, J.H.; TEMEYER, K.B. (1988). Biochemical and immunological properties of HPLC peak 2 and ion exchange fraction of common cattle grub (Diptera: Oestridae). *Journal of Economic Entomology*, **81**: 549-554.

- SEDEGAH, M. (2015). The ex vivo IFN- γ Enzyme-Linked immunospot (ELISpot) Assay. Ashley M. Vaughan (ed.), *Malaria Vaccines: Methods and Protocols*, Methods in Molecular Biology, 1325: 197-205.
- SEDGWICK, J.D.; CZERKINSKY, C. (1992). Detection of cell-surface molecules, secreted products of single cells and cellular proliferation by enzyme-immunoassay. *Journal of Immunological Methods*, **150**: 159-175.
- SERGENT, G. (1941). Sur le role pathogène possible des larves d' *Hypoderma bovis* au cours de leur migration chez les bovides. *Bulletin de l'Académie Vétérinaire Française*, **94**: 103-107.
- SHAW, R.D.; MERCHANT, A.A.; GROENE, W.S.; CHEN, E.H. (1993). Persistence of intestinal antibody-response to heterologous rotavirus infection in a murine model beyond 1 year. *Journal of Clinical Microbiology*, **31**: 188-191.
- SHER, A.; GAZZINELLI, R.T.; OSWALD, I.P.; CLERICI, M.; KULLBERG, M.; PEARCE, E.J.; BERZOFKY, J.A.; MOSMANN, T.R.; JAMES, S.L.; MORSE, H.C. (1992). Role of T-cell derived cytokines in the downregulation of immune responses in parasitic and retroviral infection. *Immunology Revisions*, **127**: 183-204.
- SHI, S.R.; KEY, M.E.; KALRA, K.L. (1991). Antigen retrieval in formalin- fixed, paraffin-embedded tissue: an enhancement method for immunohistochemical staining based on microwave oven heating of tissue sections. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, **39**: 741-748.
- SHI, S.R.; IMAM, S.; YOUNG, L.; COTE, R.J.; TAYLOR, C. R. (1995). Antigen retrieval immunohistochemistry under the influence of pH using monoclonal antibodies. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, **43**: 193-201.
- SIMMONS, S.W. (1937). Some histopathological changes caused by the larvae in the esophagus of cattle. *Journal of Parasitology*, **23**: 376-381.
- SIMPSON, D.A.; FEENEY, S.; BOYLE, C.; STITT, A.W. (2000). Retinal VEGF mRNA measured by SYBR green I fluorescence: a versatile approach to quantitative PCR. *Molecular Vision*, **6**: 178- 183.

- SINCLAIR, I.J.; TARRY, D.W.; WASSALL, D.A. (1984). Persistence of antibody in calves after an infection with *Hypoderma bovis*. *Research in Veterinary Science*, **37**: 383-384.
- SINCLAIR, I.J.; WASSALL, D.A. (1983). Enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of antibodies to *Hypoderma bovis* in cattle. *Research in Veterinary Science*, **34**: 251-252.
- SINGH, K.; CONFER, A.W.; HOPE, J.C.; RIZZI, T.; WYCKOFF III, J.H.; WENG, H. RITCHIE, J.W. (2011). Cytotoxicity and cytokine production by bovine alveolar macrophages challenged with wild type and leukotoxin-deficient *Mannheimia haemolytica*. *The Veterinary Journal*, **188**: 221-227.
- SOULAS, C.; CONERLY, C.; KIM, W.K.; BURDO, T.H.; ALVAREZ, X., LACKNER, A.A.; WILLIAMS, K.C. (2011). Recently infiltrating MAC387+ monocytes/macrophages. A third macrophage population involved in SIV and HIV encephalitic lesion formation. *American Journal of Pathology*, **178**: 2121-2135.
- STASKA, L.M.; DAVIES, C.J.; BROWN, W.C.; MCGUIRE, T.C.; SUÁREZ, C.E.; PARK, J.Y.; MATHISON, B.A.; ABBOT, J.R.; BASZLER, T.V. (2005). Identification of vaccine candidate peptides in the NcSRS2 surface protein of *Neospora caninum* by using CD4⁺ cytotoxic T lymphocytes and gamma Interferon-Secreting T lymphocytes of infected holstein cattle. *Infection and Immunity*, **73**: 1321-1329.
- STRAUS, W. (1979). Peroxidase procedures: technical problems encountered during their application. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, **27**:1349-1351.
- SUK, K.; SOMERS, S.D.; ERICKSON, K.L. (1993). Regulation of murine macrophage function by IL-4: IL-4 and IFN-gamma differentially regulate macrophage tumoricidal activation. *Immunology*, **80**: 617-624.
- SUNDARAMAN, S.; KARULIN, A.; ANSARI, T.; BENHAMOUDA, N.; GOTTWEIN, J.; LAXMANAN, S.; LEVINE, S.M.; LOFFREDO, J.T.; MCARDLE, S.; NEUDOERFL, C.; ROEN, D.; SILINA, K.; WELCH, M.;

- LEHMANN, P.V. (2015). High reproducibility of ELISPOT counts from nine different laboratories. *Cells*, **4**: 21-39.
- TALEGÓN, F. (1969). Estudios sobre la hipodermosis bovina. *Ministerio de Agricultura*. Madrid, 197 pp.
- TANGUAY, S.; KILLION, J.J. (1994). Direct comparison of ELISPOT and ELISA-based assays for detection of individual cytokine-secreting cells. *Lymphokine and Cytokine research*, **13**: 259-263.
- TARLETON, R.L. (1988). *Trypanosoma cruzi*-induced suppression of IL-2 production. Evidence for a role of suppressor cells. *Journal of Immunology*, **140**: 2769-2775.
- TARRY, D.W. (1981). Distribution of cattle warble flies in Britain. *The Veterinary Record*, **108**: 69-72.
- TASSI, P.; PUCCINI, V.; GIANGASPERO, A. (1989). Infection by the warble fly *Przhevalskiana silenus* Brauer, 1858, in the Italian goats. An update up to 1988. *Parassitologia*, **31**: 239-250.
- TAYLOR, C.R.; SHI, S.R.; BARR, N.J.; WU, N. (2002). Techniques of immunohistochemistry: principles, pitfalls, and standardization. In: Diagnostic Immunohistochemistry, ed. Dabbs DJ, pp. 3-43. Churchill Livingstone, New York, NY, 2002.
- TEMEYER, K.B.; PRUETT, J.H. (1990). Preparation of biologically active messenger RNA from larvae of the common cattle grub (Diptera: Oestridae). *Annals of the Entomological Society of America*, **83**: 55-58.
- THORPE, R.; WADHWA, M.; BIRD, C.R.; MIRESLUIS, A.R. (1992). Detection and measurement of cytokines. *Blood Reviews*, **3**: 133-148.
- TICHOPAD, A.; DILGER, M.; SCHWARZ, G.; PFAFFL, M.W. (2003). Standardized determination of real-time PCR efficiency from a single reaction set-up. *Nucleic Acids Research*, **31**: 122-127.

- TONG, N.T.; IMHOFF, J.M.; LECROISEY, A.; KEIL, B. (1981). Hypodermin A a trypsin-like neutral proteinase from the insect *Hypoderma lineatum*. *Biochemical and Biophysical Acta*, **658**: 209-219.
- TRINCHIERI, G. (2001). Regulatory role of T cells producing both Interferon γ and Interleukin 10 in persistent infection. *Journal of Experimental Medicine*, **194**: 53–57.
- VALHEIM, M.; SIGURDARDÓTTIR, O.G.; STORSET, A.K.; AUNE, L.G.; PRESS C.M. (2004). Characterization of macrophages and occurrence of T cells in intestinal lesions of subclinical paratuberculosis in goats. *Journal of Comparative Pathology*, **131**: 221-232.
- VANDESOMPELE, J.; DE PAEPE, A.; SPELEMAN, F. (2002). Elimination of primer-dimer artifacts and genomic coamplification using a two-step SYBR green I real time RT-PCR. *Analytical Biochemistry*, **303**: 95-98.
- VANGUILDER, H.D.; VRANA, K.E.; FREEMAN, W.M. (2008). Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis. *Biotechniques*, **44**: 619-626.
- VAN HECKE, D. (2002). Routine immunohistochemical staining today: choices to make, challenges to take. *Journal of Histotechnology*, **25**: 45–54.
- VÁZQUEZ, L.; DACAL, V.; LÓPEZ, C.; DÍAZ, P.; MORRONGO, P.; DÍEZ-BAÑOS, P.; PANADERO, R. (2012). Antigen-specific antibody isotypes, lymphocyte subsets and cytokine profiles in cattle naturally infested by *Hypoderma sp.* (Diptera: Oestridae). *Veterinary Parasitology*, **184**: 230-237.
- WEBSTER, K.A. (1998). Immunodiagnosis. Editado por: BOULARD, C.; O'BRIEN, D.; PITHAN, K.; SAMPIMON, O.; SOL, J.; WEBSTER, K. En: *Improvements in the control methods for Warble-fly in farm livestock*. COST 811. Comisión Europea. Bruselas.
- WEINTRAUB, J. (1961). Inducing mating and oviposition of the warble flies *Hypoderma bovis* (L.) and *Hypoderma lineatum* (De Vill.) (Diptera: Oestridae) in captivity. *Canadian Entomology*, **93**: 149-156.

- WEINTRAUB, J.; ROBERTSON, R.H.; GOODING, R.H. (1968). Experiments in hybridizing the warbles flies *Hypoderma lineatum* (De Vill.) and *Hypoderma bovis* (L.) (Diptera: Oestridae). *Canadian Journal of Zoology*, **46**: 129-133.
- WITTWER, C.T.; RIRIE, K.M.; ANDREW, R.V.; DAVID, D.A.; GUNDRY, R.A.; BALIS, U.J. (1997). The Lightcycler: a microvolume multisample fluorimeter with rapid temperature control. *Biotechniques*, **22**: 176-181.
- WONG, M.L.; MEDRANO, J. (2005). Real-time PCR for mRNA quantitation. *Biotechniques*, **39**: 75-85.
- YAKOBSON, B.; BRENNER, J.; UNGAR-WARON, H.; TRAININ, Z. (2000). Cellular immune response cytokine expression during the initial stage of bovine leukemia virus (BLV) infection determines the disease progression to persistent lymphocytosis. *Comparative Immunology Microbiology and Infectious diseases*, **23**: 197-208.
- ZAROS, L.; BRICARELLO, P.A.; AMARANTE, A.F.T.; COUTINHO, L.L. (2007). Quantification of bovine cytokine gene expression using real-time RT-PCR methodology. *Genetics and Molecular Biology*, **30**: 575-579.
- ZHAO, R.; YU, X.; YU, H.; HAN, W.; ZHAI, L.; HAN, J.; LIU, J. (2009). Immunoregulatory peptides from salivary glands of the horsefly, *Tabanus pleskei*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B*, **154**: 1-5.
- ZUMPT, F. (1965). Myasis in man and animals in the old world. *Ed. Butterworths*, Londres: 205-229.

